รายงานการวิจัย

การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมส่วนโออาร์เอฟ5ของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสในฟาร์มสุกรที่ใช้วัคซีนชนิดเชื้อเป็นและผลกระทบต่อศักยภาพการนิวทรัลไลซ์ไวรัสและการผลิตต้นแบบดีเอ็นเอวัคซีนที่มีส่วนประกอบของยีน ORF5

Genetic modification of PRRSV ORF5 in a modified live PRRSV vaccinated swine farm following an outbreak and effect on neutralizing activity, and production of DNA vaccine containing ORF5 gene

โดย

คณะผู้วิจัย

เดชฤทธิ์	**นิลอุบล**	**(หัวหน้าโครงการ)**
ธิติมา	**ไตรพิพัฒน์**	**(นักวิจัย)**
นายธวัชชัย	**หุ่นสุวรรณ**	**(นิสิตปริญญาโท)**
นายกัญจน์	**เตมียะเสน**	**(นิสิตปริญญาเอก)**

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2555

(ผลงานนี้เป็นความรับผิดชอบของคณะผู้วิจัยแต่ผู้เดียว)

กิตติกรรมประกาศ
(Acknowledgement)

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากทุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี พ.ศ. 2555 และทุนส่งเสริมวิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษาในสถาบันอุดมศึกษาของรัฐ ทบวงมหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2554

ทางทีมผู้วิจัยต้องขอขอบพระคุณฟาร์มสุกรในเครือบริษัทมิตรภาพโภคภัณฑ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ฟาร์มสุกรเพื่อดำเนินการวิจัย ภญ.ดร. จิตติมา พิริยะพงศา และนางสาวปาวิตา ทิพย์สมบัติบุญ จากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ที่ช่วยอนุเคราะห์ในด้านวิเคราะห์ข้อมูล บุคคลากรภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และบุคลากรอื่นๆ ในหน่วยฯ ที่ให้ความอนุเคราะห์ สถานที่ทำการวิจัย สารเคมี อุปกรณ์ และเทคนิคในการทำงาน

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมส่วนโออาร์เอฟห้าของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสหลังการใช้วัคซีนชนิดเชื้อเป็นสายพันธุ์อเมริกาเหนือเมื่อเกิดการระบาดของโรค ดำเนินการวิจัยโดยคัดเลือกฟาร์มที่เกิดการระบาดของโรคพีอาร์อาร์เอสและไม่เคยมีประวัติการใช้วัคซีนพีอาร์อาร์เอสทั้งชนิดเชื้อเป็นและชนิดเชื้อตายในฝูง ทำการฉีดวัคซีนชนิดเชื้อเป็นสายพันธุ์อเมริกาเหนือแบบปูพรมในแม่สุกรและสุกรสาวทดแทนทุกตัวจำนวนสองครั้งห่างกันหนึ่งเดือน ฉีดวัคซีนซ้ำทุกสามเดือนหลังจากฉีดวัคซีนเข็มที่สอง ส่วนลูกสุกรฉีดเป็นโปรแกรมที่อายุประมาณสองสัปดาห์ เก็บตัวอย่างซีรั่มในสุกรสี่กลุ่มๆละห้าตัวอย่างทุกเดือนเป็นเวลาหกเดือนติดต่อกันและตามด้วยเดือนเว้นเดือนอีกสองครั้งรวมเป็นแปดครั้ง สุกรสี่กลุ่มประกอบด้วย สุกรสาวทดแทน ลูกสุกรดูดนม สุกรอนุบาล และ สุกรขุน ได้จำนวนตัวอย่างสายพันธุกรรมทั้งหมด 277 ตัวอย่าง แบ่งเป็นสายพันธุ์ยุโรป 145 ตัวอย่าง และ สายพันธุ์อเมริกาเหนือ 132 ตัวอย่าง ก่อนการฉีดวัคซีนตรวจพบไวรัสทั้งสองสายพันธุ์ยุโรปในฟาร์ม หลังการใช้วัคซีนสายพันธุ์อเมริกาเหนือ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงในสายพันธุ์ยุโรป แต่พบการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นในสายพันธุ์อเมริกาเหนือ โดยพบการเปลี่ยนแปลงหลักในตำแหน่ง N-linked glycosylation ผลของการศึกษาวัคซีนชนิดเชื้อเป็นสายพันธุ์อเมริกาเหนือไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของไวรัสสายพันธุ์ยุโรป แต่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของไวรัสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ โดยเพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรม

ABSTRACT

The objectives were to investigate dynamic and evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) ORF5 following a modified live PRRSV vaccine (MLV) used in an outbreak herd. A PRRSV positive herd with co-existence of European (EU) and North American (NA) genotypes and no history of MLV use was recruited into the study. Following an outbreak, vaccination with a NA MLV (Boehlinger Ingelheim, USA) was implemented. All sows were mass-vaccinated at monthly interval for 2 consecutive months followed by quarterly vaccination regimen. All piglets were vaccinated at 14 days of age. Serum samples were collected monthly for six consecutive months and the other month two times from 4 population groups of 5 samples each including replacement gilts, suckling, nursery and finishing pigs. Two hundred and seventy seven complete ORF5 genes consisting of 145 EU and 132 NA isolates were obtained from the herd following a year of collection. Prior to and following vaccination, both EU and NA genotypes were independently evolved and co-existed in an individual pig. Following the vaccination, MLV vaccination had no influence on increased heterogenicity of either EU isolates (before and after vaccinated, the same isolates), but it resulted in the emergence of three novel PRRSV clusters of NA isolates in the herd including MLV-like and two MLV-related clusters. MLV-like isolates emerged and then disappeared within two months following a mass vaccination. However, there were an emergence of two PRRSV clusters which was genetically related to the MLV vaccine use during the outbreak. The difference between these 2 clusters was increased in the number of N-linked glycosylation positions. The results of the study suggested that MLV had no influence on the development of EU isolates, but resulted in increased heterogenicity of US PRRSV isolates.

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

เรื่อง	หน้า
บทนำ	**1**
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุป	3
ฟาร์มทดลอง	3
การเก็บตัวอย่างซีรั่ม	3
การตรวจสอบไวรัสและการถอดรหัสพันธุกรรมยีนโออาร์เอฟห้า	4
วิเคราะห์ข้อมูล	4
การเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอ (ส่วนที่2)	5
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	5
ขอบเขตของโครงการวิจัย	5
วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	**6**
วิธีดำเนินงานวิจัย	**11**
การดำเนินงานวิจัย	11
ส่วนที่1 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสภายในฟาร์ม	11
ฟาร์มดำเนินการวิจัย	11
การเก็บตัวอย่างซีรั่ม	13
การตรวจสอบไวรัส	13
ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เลส Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)	14
การถอดรหัสพันธุกรรมยีน ORF5	15
การวิเคราะห์ข้อมูล	15
ส่วนที่2 การเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอ	16
การเตรียมยีน ORF5 ของเชื้อไวรัส PRRS	16
การเตรียมพลาสมิด DNA	17
ผลการทดลอง	**18**
ส่วนที่1 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสภายในฟาร์ม	18
จำนวนตัวอย่าง	18
วิเคราะห์โดยวิธีแขนงกิ่งไม้	18
การจัดกลุ่มของไวรัสและการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม	25
การเปลี่ยนแปลงไวรัสภายในฝูง (Dynamic of PRRSV in a herd)	27

เรื่อง **หน้า**

การผสมสารพันธุกรรมระหว่างไวรัส (Recombination) 29

ส่วนที่2 การเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอ 29

ผลการทดลอง 29

วิจารณ์และสรุปผล **32**

สรุป 36

เอกสารอ้างอิง **37**

ภาคผนวก **41**

ภาคผนวก 1 ลำดับกรดอะมิโนของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ 42

ภาคผนวก 2 ลำดับกรดอะมิโนของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรป 43

สารบัญตาราง (List of Contents)

ตารางที่ **หน้า**

1. แสดงความเหมือนส่วนนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนโออาร์เอฟห้า เชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรป 23
2. แสดงความเหมือนส่วนนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนโออาร์เอฟห้า เชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ 23
3. แสดงจำนวนตัวอย่างแต่ละเดือนในแต่ละคลัสเตอร์ของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรป 24
4. แสดงจำนวนตัวอย่างแต่ละเดือนในแต่ละคลัสเตอร์ของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริการเหนือ 25
5. แสดงตำแหน่งการเกิด N-linked glycosylation ของไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรปและอเมริกาเหนือในคลัสเตอร์ต่างๆ 27
6. คลัสเตอร์และรูปแบบกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง decoy epitope A and neutralizing epitope B ของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ 27

สารบัญภาพ (List of Illustration)

รูปที่ **หน้า**

1. ส่วนประกอบของ GP5 ectodomain ; N-liked glycosylation site (N30 , N33 , N44 และ N51) ; decoy epitope A , neutralizing epitope B 7
2. แสดงแผนผังฟาร์มที่ดำเนินการวิจัย 12
3. แสดงแขนงกิ่งไม้ (Phylogenetic tree) ของยีนโออาร์เอฟห้าของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์สายพันธุ์ยุโรป ที่แบ่งไวรัสออกเป็น 2 คลัสเตอร์ประกอบด้วยคลัสเตอร์ 1 และ 2 โดยวงกลมสีแดงแสดงถึงไวรัสในคลัสเตอร์ที่แยกได้ตั้งแต่ก่อนฉีดวัคซีน (Prevac EU 1 และ Prevac EU 2) 21
4. แสดงแขนงกิ่งไม้ (Phylogenetic tree) ของยีนโออาร์เอฟห้าของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์สายพันธุ์อเมริกาเหนือ ที่แบ่งไวรัสออกเป็น 4 คลัสเตอร์ประกอบด้วยคลัสเตอร์ 1 2 3 และ 4 โดยวงกลมสีแดงแสดงถึงไวรัสในคลัสเตอร์ที่แยกได้ตั้งแต่ก่อนฉีดวัคซีน (Prevac US 1) และสามเหลี่ยมสีน้ำเงินแสดงถึงวัคซีนพีอาร์อาร์เอสชนิดเชื้อเป็นที่ใช้ในการฉีดฝูงสุกร 22
5. การเกิดขนาดของแต่ละกลุ่มไวรัสสายพันธุ์อเมริกาเหนือในแต่ละเดือน 28
6. การตรวจสอบขนาด PCR product ของยีนGP5-PADREที่ได้จากการเตรียมรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วย 2% gel electrophoresis 29

บทที่ 1
บทนำ (Introduction)

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

โรคพีอาร์อาร์เอส เกิดจากการติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส (Collins et al., 1992; Wensvoort et al., 1992) เป็นโรคสำคัญที่สร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจแก่ อุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรทั่วโลก รวมถึงประเทศไทย ก่อให้เกิดอาการผิดปรกติของระบบสืบพันธุ์ในฝูงสุกรแม่พันธุ์ เช่น แท้ง กลับสัด ในสุกรอุ้มท้อง จำนวนลูกสุกรตายแรกคลอดและอัตราตายก่อนหย่านมสูง และโรคระบบทางเดินหายใจแทรกซ้อน (Porcine respiratory disease complex) ในฝูงสุกรอนุบาลและขุน โดยในประเทศสหรัฐอเมริกานั้นพบว่าโรคพีอาร์อาร์เอส สร้างความเสียหายถึงปีละ 560.32 ล้านดอลล่าร์ (Neumann et al., 2005) แม้ในประเทศไทยยังไม่มีรายงานความเสียหายทางเศรษฐกิจอย่างเป็นรูปธรรม แต่ก็พบว่าฟาร์มสุกรในประเทศไทยมากกว่า 80 เปอร์เซนต์เป็นฟาร์มที่ติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส

ด้วยความเสียหายทางเศรษฐกิจที่เกิดขึ้น ทำให้เกษตรกรตระหนักถึงวิธีการที่สามารถควบคุม และป้องกันโรคพีอาร์อาร์เอสอย่างมีประสิทธิภาพ เกษตรกรจึงได้มีการนำวัคซีนเช่น วัคซีนพีอาร์อาร์เอสชนิดเชื้อเป็น (Ingelvac PRRS MLV®, Boehringer Ingelheim, USA) มาใช้ในการควบคุมโรค แต่เกษตรกรกลับพบว่าวัคซีนพีอาร์อาร์เอสที่มีจำหน่ายอยู่ในปัจจุบันไม่ให้ผลคุ้มโรคเท่าที่ควร พบลักษณะอาการคล้ายโรคพีอาร์อาร์เอส เช่น การแท้ง ลูกตายแรกคลอด มัมมี่ และพบความเสียหายเช่นลูกสุกรแรกคลอดอ่อนแอ การเพิ่มขึ้นของปัญหาโรคทางเดินหายใจอาการทางระบบประสาทเช่นชัก และข้อบวมในสุกรก่อนหย่านมและอนุบาลอย่างต่อเนื่อง ในฟาร์มที่มีการใช้วัคซีนพีอาร์อาร์เอสชนิดเชื้อเป็น เป็นประจำ (Nilubol, D., 2010, personal observation)

สาเหตุที่วัคซีนป้องกันโรคพีอาร์อาร์เอสไม่สามารถใช้ป้องกันโรคอย่างมีประสิทธิภาพ อาจเนื่องมาจากความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างวัคซีนที่จำหน่ายและเชื้อที่เกิดการระบาดในฟาร์ม และคุณสมบัติการเป็น quasi-species ของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส (Goldberg et al., 2003) ที่ไวรัสลูกหลาน (progeny viruses) มีลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างจากไวรัสตั้งต้น โดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงส่วนยีน ORF 5 (Chang et al., 2002; Meng et al., 1995a; Meng et al., 1995b; Murtaugh et al., 1998) ที่ทำหน้าที่สร้าง Glycoprotein 5 และมีส่วน Neutralizing epitope B อยู่ (Ostrowski et al., 2002; Plagemann, 2004; Plagemann et al., 2002)

ผู้วิจัยได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมส่วน ORF5 ของไวรัสพีอาร์อาร์เอสในสุกรพบว่าไวรัสลูกหลานสายพันธุ์อเมริกาเหนือมีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากไวรัสต้นแบบมาก (นิลอุบล 2552, ทุน

พัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ปี 2550) เมื่อไวรัสลูกหลานมีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมเป็นกลุ่มไวรัสไอโซเลตใหม่ที่แตกต่างไปจากสายพันธุ์เดิม และสามารถเปลี่ยนแปลงทางการเป็นแอนติเจน (antigenic variation) ภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นต่อเชื้อไวรัสตัวเดิมไม่สามารถจดจำได้เชื้อตัวใหม่ที่เกิดขึ้นส่งผลให้สุกรสามารถเกิดการติดเชื้อได้ใหม่อีกครั้ง อาจเป็นเหตุผลที่ทำให้ฟาร์มที่ใช้วัคซีนพีอาร์อาร์เอสสามารถเกิดการระบาดใหม่ได้จากเชื้อไวรัสในวัคซีนที่เกิดการกลายพันธุ์ขึ้น และอาจเกิด recombination ระหว่างเชื้อไวรัสในวัคซีนและเชื้อไวรัสเดิมที่อยู่ในฟาร์ม ส่งผลให้เกิดไวรัสไอโซเลตใหม่ที่อาจก่อให้เกิดการระบาดได้

ทีมผู้วิจัยได้สำรวจความแตกต่างทางพันธุกรรมของยีนโออาร์เอฟห้าของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสในฟาร์มสุกรที่ตั้งอยู่ในพื้นที่ที่มีการเลี้ยงสุกรอย่างหนาแน่นในประเทศไทย เช่นจังหวัดนครปฐม ราชบุรี ชลบุรี เชียงใหม่ สระบุรีและอื่นๆ ในช่วงปีพ.ศ. 2552 - 2553 และเปรียบเทียบกับเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่รายงานในปีพ.ศ. 2547 (Thanawongnuwech et al., 2004) พบว่าเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสมีอัตราการกลายพันธุ์ที่สูงมากโดยเฉพาะไวรัสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ ที่ปัจจุบัน สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่ม (clusters) จากเดิมที่มีแค่ 1 กลุ่มในปีพ.ศ. 2547 (Nilubol et al., 2013) แต่อย่างไรก็ตามพบว่าการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่สำคัญพบที่ส่วนระหว่าง decoy epitope A และ neutralizing epitope B โดยมีกลไก N-liked glycosylation site เป็นกลไกสำคัญที่ไวรัสพีอาร์อาร์เอสใช้ในการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมของเชื้อไวรัสลูกหลาน แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงในส่วน neutralizing epitope B นอกจากนั้นพบว่าไวรัสในกลุ่ม (clusters) ที่อุบัติขึ้นใหม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากไวรัสตั้งต้นมาก และมีความแตกต่างทางพันธุกรรมในส่วน decoy epitope A และ N-liked glycosylation site มาก การมี decoy epitope A และการกลายพันธุ์ในส่วนนี้ อาจเป็นสาเหตุให้การกระตุ้นภูมิคุ้มกัน มีการสร้างแอนติบอดี้แบบ non-neutralizing antibody แทน neutralizing antibody ทำให้ไม่สามารถป้องกันการระบาดของโรคพีอาร์อาร์เอสได้ ถ้ามีการตัดส่วน decoy epitope A ออกหรือมีการแทรกด้วยสายพันธุกรรมบางอย่างทำให้ decoy epitope A อยู่ห่างจาก neutralizing epitope B อาจทำให้ร่างกายมีการกระตุ้น neutralizing antibody ได้ดีขึ้น

จากเหตุผลดังกล่าว ทำให้ผู้วิจัยสนใจการวิจัยศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อหลังจากได้รับวัคซีนเชื้อเป็น ในฟาร์มสุกร และการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสว่ามีการเปลี่ยนแปลงอย่างไร พันธุกรรมที่เปลี่ยนไปของไวรัสส่งผลต่อฟาร์มอย่างไร และนอกจากนั้นผู้วิจัยยังสนใจที่จะผลิตวัคซีนป้องกันโรคพีอาร์อาร์เอส รูปแบบใหม่ เป็นพลาสมิคดีเอ็นเอที่มีส่วนประกอบของยีนโออาร์เอฟห้า และมีการแทรก PAN DR helper T-cell epitope (PADRE) ที่ส่วนระหว่าง decoy epitope A และ neutralizing epitope B เพื่อเป็นต้นแบบดีเอ็นเอวัคซีนสำหรับใช้ทดลองในสุกรต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุป

โครงการวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือส่วนที่ 1 เป็นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสไวรัสพีอาร์อาร์เอสและส่วนที่ 2 เป็นการผลิตต้นแบบดีเอ็นเอวัคซีน โดยสามารถดำเนินงานทั้ง 2 ส่วนพร้อมกันได้

ฟาร์มทดลอง

คัดเลือกฟาร์มสุกรขนาด 1,000 - 1,200 แม่จำนวน 1 ฟาร์ม ที่มีระบบการเลี้ยงในพื้นที่เดียวกันทั้งแม่สุกร สุกรอนุบาลและสุกรขุน (one site system) สุกรอนุบาลและสุกรขุนเลี้ยงระบบเข้า-หมด ออก-หมด (all-in all-out) เพื่อหลีกเลี่ยงการรับเชื้อระหว่างชุด (lateral infection) สุกรสาวแม่ทดแทนผลิตภายในฟาร์มเอง (internal replacement gilt) โดยมีโรงเรือนโดยเฉพาะเพื่อการปรับสภาพสุกรสาวทดแทนก่อนนำเข้าฝูงแม่สุกร (gilt acclimatization) และมีอัตราการทดแทนสุกรสาวทดแทน 40-50 เปอร์เซ็นต์ โรงเรือนสุกรพันธุ์จะแยกพื้นที่ออกจากโรงเรือนสุกรอนุบาลและสุกรขุน โรงเรือนสุกรอุ้มท้องจะแยกอยู่คนละโรงเรือนสุกรเลี้ยงลูก และใช้การฉีดวัคซีนชนิดเชื้อเป็นของโรคพีอาร์อาร์เอส (Ingelvac PRRS MLV, Boehringer Ingelheim, USA) โดยฉีดแบบปูพรม (mass vaccination) ทุก ๆ 3 เดือนในแม่สุกรนาง และฉีด 2 เข็มระยะห่าง 1 เดือนในสุกรสาวทนแทนก่อนส่งขึ้นฝูง

การเก็บตัวอย่างซีรั่ม

ทำการเก็บตัวอย่างซีรั่มภายหลังจากฉีดวัคซีนชนิดเชื้อเป็นทุก 2 เดือนต่อเนื่องจนครบ 6 เดือน จากกลุ่มสุกร 4 กลุ่ม หลังเกิดการระบาดของโรคพีอาร์อาร์เอสในฟาร์มสุกร

1. สุกรสาวทดแทนจำนวน 10 ตัวอย่าง
2. ลูกสุกรจำนวน 10 ตัวอย่าง
3. สุกรสุกรอนุบาลจำนวน 10 ตัวอย่าง
4. สุกรขุนจำนวน 10 ตัวอย่าง

นำซีรั่มที่แยกได้มาตรวจหาเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสเพื่อถอดรหัสพันธุกรรมยีนโออาร์เอฟห้า

การตรวจสอบไวรัสและการถอดรหัสพันธุกรรมยีนโออาร์เอฟห้า

นำตัวอย่างซีรั่มมาคัดกรองหาเชื้อไวรัสไวรัสพีอาร์อาร์เอสบนเซลล์เพาะเลี้ยง MARC 145 ที่เลี้ยงใน 96 wells plate และตรวจหาเชื้อไวรัสหลังเพาะเลี้ยงเชื้อได้ 48 ชั่วโมง โดยย้อมด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี้ SDOW-17 ผ่านวิธี Fluorescent antibody assay จากนั้นจึงนำตัวอย่างที่ให้ผลบวกจากการคัดกรองเบื้องต้นมาถอดรหัสพันธุกรรม โดยเริ่มต้นจากการสกัดอาร์เอ็นเอด้วยชุดแยกสำเร็จรูป นำตัวอย่างอาร์เอ็นเอ

ที่แยกได้มาสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอ (cDNA) ด้วยชุดสังเคราะห์สำเร็จรูปและนำซีดีเอ็นเอ (cDNA) ที่สังเคราะห์ได้มาทำปฏิกริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (PCR) โดยใช้ primers ที่มีความจำเพาะต่อส่วนยีนโออาร์เอฟห้าของสายพันธุ์อเมริกาเหนือและยุโรป

นำผลผลิตจากปฏิกริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (PCR product) ไปทำการ ligate เข้าพลาสมิดโดยใช้ชุด pGEM-T easy (promega, USA) ผสมสารเคมีต่างๆตามคู่มือของชุดทดสอบ หลังจากนั้นทำการ transform พลาสมิด เข้าไปในเชื้อแบคทีเรีย *E coli* สายพันธุ์ JM 109 โดยใช้ heat shock ตามชุดทดสอบเลี้ยงแบคทีเรียที่ transform แล้วใน LB agar ที่เตรียมโดยใส่ agar technical (Becton Dickinson, USA) 17 กรัม ลงใน Difco™ LB Broth (Becton Dickinson, USA) ปริมาณ 1 ลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานประมาณ 12-16 ชั่วโมง จะได้โคโลนีสีฟ้าและสีขาว ทำการเลือกโคโลนีสีขาวจำนวน 1 – 5 โคโลนี (1 – 5 โคลน) และตั้งชื่อโคลน แล้วทำการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียโดยเลี้ยงใน Difco™ LB Broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 12-16 ชั่วโมง และนำแบคทีเรียมาสกัดพลาสมิดโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป แล้วทำการส่งถอดรหัสพันธุกรรม เพื่อหาลำดับเบส และใช้เป็นข้อมูลรหัสทางพันธุกรรมของไวรัสลูกหลาน เพื่อวิเคราะห์สายพันธุกรรมและตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม

วิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลของสายพันธุกรรมของไวรัสพีอาร์อาร์เอสจากกลุ่มประชากรต่างๆมาเชื่อมโยงความสัมพันธุ์และจัดแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) ด้วยโปรแกรม MEGA 5 โดยใช้วิธี Neighbor-Joining ค่า Bootstrap test คำนวณจาก 1,000 replicates

การเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอ (ส่วนที่ 2)

นำเชื้อไวรัสแยกได้มาเพิ่มจำนวนในเซลล์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (MARC145, ATCC) สกัดอาร์เอ็นเอจากเชื้อไวรัสที่แยกได้ โดยใช้ชุดสกัดอาร์เอ็นเอสำเร็จรูป นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจหา RNA ของเชื้อไวรัสด้วยวิธี ปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (Polymerase chain reaction, PCR) โดยเปลี่ยนส่วนอาร์เอ็นเอที่สกัดได้เป็น cDNA และนำ cDNA ที่ได้ มาทำปฏิกริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสที่มีความจำเพาะต่อยีนORF 5 ของเชื้อไวรัส นำผลิตภัณฑ์ปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอร์ (PCR product) มาทำให้บริสุทธิ์เพื่อให้ได้ส่วนพันธุกรรมของยีน ORF5

นำส่วนพันธุกรรมของยีน ORF 5 ที่แยกได้ มาเตรียมเป็น plasmid DNA โดยนำส่วนยีน ORF5 มาโคลนเข้า transfer vector ตัดยีนส่วนที่ต้องการโดยใช้เอ็มไซม์ (restricted enzymes) และนำยีนส่วนตัดมา insert เข้า eukaryotic expression plasmid นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่เตรียมได้มาทำให้บริสุทธิ์และพัฒนาเป็นดีเอ็นเอวัคซีนที่แทรก PADRE (Alexander et al., 2000; del Guercio et al., 1997)

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมส่วนยีน ORF5 ของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส (progeny viruses) ที่แยกได้จากฟาร์มสุกรที่ฉีดวัคซีนพีอาร์อาร์เอสชนิดเชื้อเป็น

- ผลิตต้นแบบดีเอ็นเอวัคซีน ที่มีส่วนประกอบของยีน ORF5 และมีการแทรก PADRE sequence ระหว่างตำแหน่ง decoy epitope A และ neutralizing epitope B

ขอบเขตของโครงการวิจัย

- ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมส่วนยีน ORF5 ของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส (progeny viruses) ที่แยกได้จากฟาร์มสุกรที่ฉีดวัคซีนพีอาร์อาร์เอสชนิดเชื้อเป็น เป็นเวลา 6 เดือน
- ผลิตต้นแบบดีเอ็นเอวัคซีน ที่มีส่วนประกอบของยีน ORF5 และมีการแทรก PADRE sequence ระหว่างตำแหน่ง decoy epitope A และ neutralizing epitope B

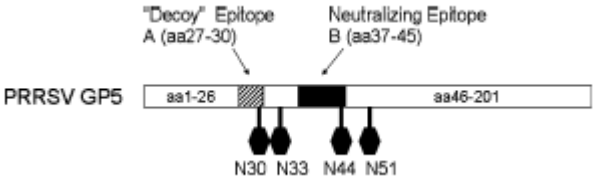
บทที่ 2
วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง (Literature Review)

โรคพีอาร์อาร์เอสเกิดจากการติดเชื้อ ไวรัสพีอาร์อาร์เอส (Collins et al., 1992; Wensvoort et al., 1992) ซึ่งเป็นอาร์เอ็นเอไวรัสชนิดสายเดียวและมีเปลือกหุ้มที่จัดอยู่ใน genus *Arterivirus* ตระกูล *Arteriviridae* (Cavanagh, 1997) ไวรัสพีอาร์อาร์เอส ประกอบไปด้วย 8 Open reading frames (ORFs) คือ ORFs 1-7 และสามารถแบ่งออกเป็น 2 สายพันธุ์หลัก คือสายพันธุ์อเมริกาเหนือ (North American genotype) และสายพันธุ์ยุโรป (European genotype) ตามทวีปที่มีการค้นพบครั้งแรก ในประเทศแถบทวีปอเมริกาเหนือเช่น สหรัฐอเมริกา และ แคนาดา พบการระบาดของไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือเป็นหลัก มีรายงานการแยกเชื้อสายพันธุ์ยุโรปบ้างเมื่อประมาณปี พ.ศ. 2542 แต่ก็ไม่ได้สร้างความเสียหายมากนัก และหลังจากนั้นก็ไม่เคยมีการค้นพบอีกเลย และจนถึงปัจจุบันก็ยังไม่สามารถอธิบายได้ว่าเกิดจากสาเหตุใด ในประเทศแถบทวีปยุโรปพบการระบาดของไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรปเป็นหลัก ยกเว้นในบางประเทศ เช่น เดนมาร์ก ที่พบไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือได้ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2539 ซึ่งมีสาเหตุมาจากการนำวัคซีนโรคพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือชนิดเชื้อเป็นไปใช้ในฝูงพ่อพันธุ์และเชื้อไวรัสวัคซีนได้แพร่กระจายไปตามฟาร์มต่างผ่านทางน้ำเชื้อ (Botner et al., 1994; Botner et al., 1997) สำหรับประเทศไทยพบการติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส ตั้งแต่ปีพ.ศ. 2532 และสามารถแยกเชื้อไวรัส ได้ทั้งสายพันธุ์อเมริกาเหนือ และสายพันธุ์ยุโรป โดยรายงานเมื่อประมาณปี พ.ศ. 2548 พบว่ามีสายพันธุ์ยุโรป อยู่ประมาณ 66.42% และมีสายพันธุ์อเมริกาเหนืออยู่ประมาณ 33.58% (Thanawongnuwech et al., 2004) แต่ในปัจจุบันความชุกของเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงไปเพราะพบไวรัสสายพันธุ์อเมริกาเหนือเพิ่มมากขึ้นและมีความแตกต่างทางพันธุกรรมสูง (Nilubol et al., 2013) ส่วนสาเหตุของการเปลี่ยนแปลงที่พบไวรัสสายพันธุ์อเมริกาเหนือเพิ่มมากขึ้นยังไม่ทราบแน่ชัด และการติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสในฟาร์มสุกรไทย พบว่าฟาร์มส่วนใหญ่ติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสมากกว่า 1 สายพันธุ์ และมากกว่าครึ่งเป็นการติดเชื้อร่วมกันของสายพันธุ์อเมริกาเหนือและสายพันธุ์ยุโรป ลักษณะการติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสของประเทศไทย ที่พบทั้งสองสายพันธุ์อยู่ในฟาร์มเดียวกัน แตกต่างจากการติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสของประเทศอื่น

ไวรัสพีอาร์อาร์เอสเป็นอาร์เอ็นเอไวรัส ซึ่งอาร์เอ็นเอไวรัสนี้เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอไวรัสแล้ว จะไม่มีขบวนการ Proof-reading ที่ใช้ในการตรวจสอบการแปลรหัสนิวคลีโอไทด์ในการถ่ายทอดทางพันธุกรรม ทำให้การแปลรหัสนิวคลีโอไทด์มีโอกาสที่จะเกิดความผิดผลาดสูง ส่งผลให้เกิดการกลายพันธุ์ (Mutation) ได้ง่าย และไวรัสมีความแตกต่างทางพันธุกรรมสูง ความสามารถในการกลายพันธุ์ที่สูงนี้สามารถพบได้ทั้งไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือและยุโรป ส่วนทางพันธุกรรมของไวรัสที่พบการเปลี่ยนแปลงมากที่สุดคือส่วนของ ORF 5 ที่แปรเป็นส่วนประกอบของโปรตีนบนผนังเซลล์ (Glycoprotein 5, GP5) (Chang et al., 2002; Meng et al., 1995a; Meng et al., 1995b; Murtaugh et al., 1998) ส่วน GP5 นี้เองที่พบว่ามี neutralizing epitope และเป็นส่วนที่กระตุ้นในเกิดแอนติบอดี้ที่มีคุณสมบัติในการป้องกันการเข้าสู่เซลล์

(Neutralizing antibodies) (Ostrowski et al., 2002; Plagemann, 2004; Plagemann et al., 2002) ส่งผลในการป้องกันการติดเชื้อ

ไวรัสพีอาร์อาร์เอสจัดเป็นไวรัสที่มีความหลากหลายพันธุกรรมเนื่องจากตัวไวรัสเองมี RNA polymerase enzyme ที่มีประสิทธิภาพต่ำ ส่วนที่มีความหลากหลายมากที่สุดของไวรัสพีอาร์อาร์เอสคือ GP5 โดยใน GP5 พบว่าส่วนของ ectodomain จะเป็นส่วนที่มีความแตกต่างมากที่สุด (Meulenberg et al., 1997) โครงสร้าง GP5 ประกอบไปด้วยส่วนที่อยู่ด้านนอกของไวรัส (ectodomain) และทางด้าน N-terminal ประกอบไปด้วย signal peptide sequence ถัดมาจะมีส่วนของ การเกิด glycosylation ที่เรียกว่า N-linked glycosylation site โดยที่จะมีไกลโคเจนมาเชื่อมต่อกับกรดอะมิโน asparagine มีประมาณ 2-4 ตำแหน่ง (ภาพที่ 1) รวมทั้งมีส่วนของ epitope ส่วนที่เป็น non-neutralizing epitope (decoy epitope A) และส่วนของ neutralizing epitope B โดยที่ส่วน decoy epitope A จะอยู่ส่วนหน้าของ neutralizing epitope B (ภาพที่ 1) (Ostrowski et al., 2002) พบว่า decoy epitope A อยู่บริเวณตำแหน่ง 27-30 และ neutralizing epitope B อยู่ที่ตำแหน่ง 37-45



ภาพที่ 1 ส่วนประกอบของ GP5 ectodomain ; N-liked glycosylation site (N30 , N33 , N44 และ N51) ; decoy epitope A , neutralizing epitope B **(อ้างอิงจาก Meulenberg., j. 1997)**

ไวรัสพีอาร์อาร์เอส มีคุณสมบัติเป็น Quasi-species (Goldberg et al., 2003) คือ ทุกครั้งที่ไวรัสเพิ่มจำนวน ส่วนของ Progeny viruses ที่เกิดขึ้น จะมีพันธุกรรมที่แตกต่างจากไวรัสตัวตั้งต้น มากหรือน้อยแตกต่างกันไป (Domingo, 1992) แต่อย่างไรก็ตามยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่า Progeny viruses ที่เกิดขึ้นเหล่านี้ จะมีการเปลี่ยนแปลงอย่างไรและมีการดำรงอยู่ในรูปแบบใด เช่น Progeny viruses ทุกตัวสามารถดำรงอยู่ด้วยกันได้ หรือจะมี progeny viruses เพียงบางตัวเท่านั้นที่อยู่รอดและพัฒนาเป็นสายพันธุ์ใหม่ ที่กลายไปเป็นไวรัสสายพันธุ์ใหม่ที่แตกต่างไปจากสายพันธุ์เดิมอย่างสิ้นเชิง ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางการเป็นแอนติเจนและส่งผลทำให้ภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นต่อเชื้อไวรัสตัวเดิมไม่สามารถจดจำได้เชื้อตัวใหม่ที่เกิดขึ้นได้ ทำให้สามารถเกิดการติดเชื้อได้ใหม่อีกครั้ง ซึ่งอาจจะเป็นเหตุผลที่ทำให้ฟาร์มที่เคยระบาดจากโรคพีอาร์อาร์เอสก็ยังสามารถเกิดการระบาดใหม่ได้จากเชื้อตัวเดิมหรือต่างชนิดทำให้โรคพีอาร์อาร์เอสเป็นโรคที่ยากต่อการควบคุมและป้องกัน

ความแตกต่างทางพันธุกรรมของไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่กล่าวมาข้างต้น มีสาเหตุหลักจากขบวนการ proof reading ที่มีประสิทธิภาพต่ำ ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutation) ได้ง่าย แต่ในเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสยังมีอีกขบวนการ recombination ที่สามารถทำให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมได้ ในกรณีที่มีการติดเชื้อร่วมของไวรัสสายพันธุ์เดียวกันแต่มากกว่า 2 ไอโซเลต เช่น ไอโซเลตจากสายพันธุ์อเมริกาเหนือทั้งคู่ พบว่า Progeny viruses ของทั้งสองสายพันธุ์ที่เกิดขึ้นหลังจากที่ไวรัสเพิ่มจำนวน สามารถดำรงอยู่ด้วยกันได้ โดยแต่ละสายพันธุ์จะมีการกลายพันธุ์แยกกันและจะมีบางส่วนที่สามารถเกิดการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรมของสองสายพันธุ์ (Genetic recombination) (Yuan et al., 1999)

ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาโดยการให้เชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสแก่สุกรในห้องทดลอง โดยแบ่งสุกรออกเป็น 4 กลุ่มประกอบด้วย NEG US EU และ MIX กลุ่ม NEG เป็นกลุ่มควบคุมลบ กลุ่ม US และ EU เป็นกลุ่มติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ (US) และสายพันธุ์ยุโรป (EU) ตามลำดับ กลุ่ม MIX เป็นกลุ่มติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสร่วมทั้งสายพันธุ์ยุโรปและสายพันธุ์อเมริกาเหนือ แยก progeny viruses และถอดรหัสพันธุกรรม ผลการศึกษาผลว่าสุกรกลุ่ม MIX เกิดอาการโรคที่รุนแรงมากกว่าสุกรกลุ่มที่ติดเชื้อเดี่ยว และการตรวจ ลำดับเบสยีนส่วน Open reading frame 5 ได้แสดงให้เห็นว่า ภายหลังการให้เชื้อสุกรหนึ่งตัวสามารถตรวจพบไวรัสพีอาร์อาร์เอสได้หลายสายพันธุ์ (multiple isolates) (ภาพที่ 2 และ 3) และพบความแตกต่างทางพันธุกรรมของไวรัสลูกหลาน (progeny viruses) จากไวรัสตั้งต้น และยังพบว่าผลการถอดรหัสพันธุกรรมพบว่าเชื้อไวรัสลูกหลานที่แยกได้จากกลุ่มสุกรที่ติดเชื้อร่วม (MIX) มีความแตกต่างทางพันธุกรรมมากกว่าเชื้อไวรัสลูกหลานที่แยกได้จากกลุ่มติดเชื้อเดี่ยว (สายพันธุ์ยุโรปหรืออเมริกาเหนือเพียงอย่างเดียว) และความแตกต่างทางพันธุกรรมเชื้อไวรัสลูกหลานที่แยกได้จากกลุ่มติดเชื้อร่วมช่วงวันที่ 30 เมื่อเปรียบเทียบกับไวรัสต้นแบบ น้อยกว่า ความแตกต่างทางพันธุกรรมของ เชื้อไวรัสลูกหลานที่แยกได้ช่วงวันที่ 10 และพบไวรัสลูกหลานที่เกิดการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรมของสองสายพันธุ์ทุกช่วงเวลา (genetic recombination) ทำให้สรุปผลได้ว่าการติดเชื้อร่วมสองสายพันธุ์สามาถเร่งการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสลูกหลาน แต่ละสายพันธุ์เปลี่ยนแปลงโดยตัวเองแต่จะมีไวรัสที่เกิดจากการแลกเปลี่ยนพันธุกรรมของสองสายพันธุ์ตลอดเวลา และไวรัสลูกหลานที่แยกได้หลังจากการให้เชื้อพบว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากไวรัสต้นแบบมาก และ progeny viruses บาง clade จะโดดเด่นออกมา (dominant mutants) (นิลอุบล, โครงการวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ปีงบประมาณ พ.ศ. 2551) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของ progeny viruses ที่ความแตกต่างทางพันธุกรรมจากไวรัสต้นแบบมาก ทำให้ผู้วิจัยสนใจที่จะทำการศึกษาเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงของ neutralizing epitope ของ progeny viruses ที่แยกได้และ cross neutralizing activity ของซีรั่มที่เก็บหลังจากการระบาดต่อ progeny viruses เหล่านี้

ในประเทศไทยปัจจุบันการควบคุมและป้องโรคพีอาร์อาร์เอสมี 2 วิธีคือการใช้วัคซีนเพื่อควบคุมโรคและใช้การวางระบบการจัดการสุกรสาวทดแทน ในวิธีหลังนี้จะไม่เน้นการใช้วัคซีน จากประสบการณ์ของทีมผู้วิจัยพบว่า แต่ละวิธีมีข้อดีและข้อเสียที่แตกต่างกัน แต่อย่างไรก็ตามพบว่าฟาร์มที่ใช้การวางระบบ การจัดการ

สุกรสาวทดแทนในการป้องกันโรคพีอาร์อาร์เอส ให้ผลผลิตที่ดีกว่าฟาร์มที่ใช้วัคซีนในการป้องกันโรค ฟาร์มสุกรที่ฉีดวัคซีนอย่างต่อเนื่องมีผลผลิตที่ไม่ดีนักและพบอาการคล้ายโรคพีอาร์อาร์เอส อยู่เป็นระยะ ๆ ตลอดเวลาเช่นการแท้งและลูกแรกอ่อนแอและโรคทางเดินหายใจในสุกรอนุบาล ขุน เป็นช่วงๆ แสดงว่าการใช้วัคซีนไม่สามารถควบคุมโรคได้สมบูรณ์แบบร้อยเปอร์เซ็นต์

ปัจจุบันในประเทศไทยมีวัคซีนป้องกันโรคพีอาร์อาร์เอสทั้งแบบวัคซีนเชื้อเป็น และวัคซีนเชื้อตาย โดยวัคซีนชนิดเชื้อเป็นมีทั้งวัคซีนที่ผลิตจากไวรัสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ (Ingelvac PRRS MLV, Boehlinger Ingelheim, USA) และวัคซีนที่ผลิตมาจากไวรัสสายพันธุ์ยุโรป (AMERVAC-PRRS, Hipra Laboratories, Spain) ส่วนวัคซีนเชื้อตาย มีเพียงวัคซีนที่ผลิตมาจากไวรัสสายพันธุ์ยุโรป (SUIPRAVAC-PRRS, Hipra Laboratories, Spain) นอกจากนั้นยังมีวัคซีนชนิด subunit ที่นำเข้าจากประเทศเกาหลี โปรแกรมที่ใช้ในฟาร์มสุกรของประเทศไทย มีความแตกต่างกันสูง แต่โดยส่วนใหญ่จะใช้ปูพรมฝูงแม่พันธุ์ทุกๆ 2 – 3 เดือน และใช้ในสุกรสาวทดแทน 2 ครั้งก่อนเข้า

ปัญหาที่พบสำหรับวัคซีนป้องกันโรคพีอาร์อาร์เอสคือ การกลับมาทำให้เกิดโรคของไวรัสของวัคซีน (Botner et al., 1997; Madsen et al., 1998; Nielsen et al., 2001) การกดระบบภูมิคุ้มกันที่ส่งผลให้กดการทำงานของเซลล์ ที-ลิมโฟไซต์ (Bassaganya-Reira et al., 1999; Bassaganya-Riera et al., 2004) นอกจากนั้น เนื่องจากความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสที่มีสูง ทำให้สายพันธุกรรมบางส่วนของไวรัสที่ก่อให้เกิดการระบาดในฟาร์มแตกต่างจากไวรัสในวัคซีน ส่งผลให้วัคซีนมีความสามารถในการป้องกันเพียงบางส่วน (partial protection) หรือไม่มีความสามารถในการ cross protection ต่อการติดเชื้อไวรัสที่มีสายพันธุ์ที่แตกต่างจากไวรัสของวัคซีน (Mengeling et al., 2003)

เมื่อตระหนักถึงผลกระทบและข้อเสียที่เกิดจากการใช้วัคซีนป้องกันโรคพีอาร์อาร์เอสชนิดเชื้อเป็น ทำให้ในช่วงหลายปีที่ผ่านมา ได้มีความรายงานการค้นคว้าและวิจัยเพื่อพัฒนาวัคซีนพีอาร์อาร์เอสรูปใหม่ออกมามากมาย เช่น ดีเอ็นเอวัคซีนที่ใช้ยีน ORF 2, 3, 4, 5, 6 หรือ 7 โคลนเข้าในส่วน mammalian expression vector และนำฉีดพลาสมิดดีเอ็นเอที่มียีนส่วนต่างๆ กลับเข้าไปในสุกรและวัดระดับ neutralizing antibody ปรากฏว่า หลังจากการฉีด ดีเอ็นเอวัคซีนที่ใช้ยีน ORF 5 เท่านั้นที่มีระดับ neutralizing antibody แต่ปรากฏในระดับต่ำ (Kwang et al., 1999) นอกจากนั้นยังมีรายงานเกี่ยวกับวัคซีนแบบ chimeric ที่ใช้วัคซีนชนิดเชื้อเป็น เป็น backbone และ delete ส่วนที่ก่อให้เกิดการ virulence ออก หรือ infectious clones ที่ delete ส่วนก่อให้เกิดการ virulence ออก แต่ก็ยังไม่ประสบผลสำเร็จ ในการกระตุ้นสร้าง neutralizing antibody และ cell mediated immunity (Ellingson, J.S., et al., 2010)

ทางทีมผู้วิจัยสนใจรายงานการผลิตวัคซีน ที่ใช้ PAN DR helper T-cell epitope (PADRE) ซึ่งเป็น short linear peptides มา construct กับ plasmodium-derived B-cells epitope (Alexander et al., 2000) ซึ่งสามารถกระตุ้นระดับ neutraling antibody และ cell mediated immune immunity ได้ดี

บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

การดำเนินงานวิจัย

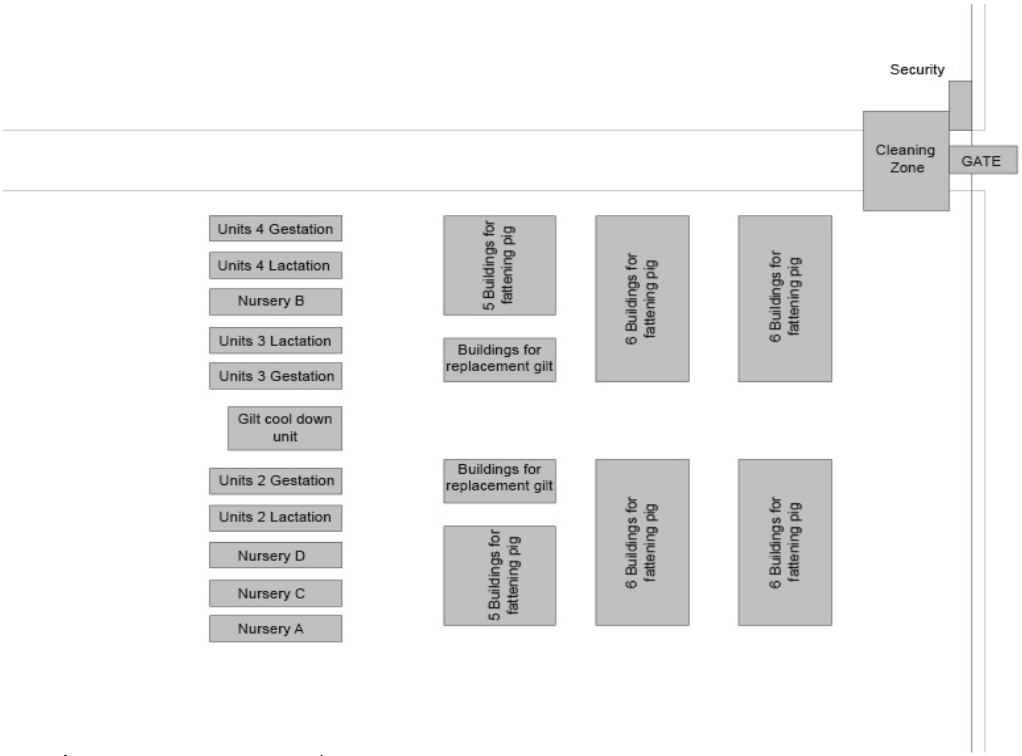
แบ่งการดำเนินงานวิจัยออกเป็น 2 ส่วนประกอบด้วย ส่วนที่ 1 เป็นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสภายในฟาร์ม และส่วนที่ 2 เป็นการเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอ

ส่วนที่ 1 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสภายในฟาร์ม

ฟาร์มดำเนินการวิจัย

ดำเนินงานวิจัยในฟาร์มสุกรขนาด 1,700 แม่ ตั้งอยู่ในเขตจังหวัดภาคกลางของประเทศไทย โดยฟาร์มที่ดำเนินการวิจัยเป็นฟาร์มที่ไม่เคยมีประวัติการใช้วัคซีนพีอาร์อาร์เอส ทั้งชนิดเชื้อเป็นและเชื้อตายเพื่อควบคุมโรคพีอาร์อาร์เอสก่อนดำเนินการวิจัย ฟาร์มมีระบบการเลี้ยงแบบ 1 จุดการผลิต (one-site production system) หรือ คลอดถึงขุน (Farrow-to-finish) ฟาร์มมีการเลี้ยงสุกรทุกช่วงการผลิต ประกอบด้วยแม่สุกรพันธุ์ สุกรอนุบาลและสุกรขุน อยู่ในพื้นที่เดียวกันหมด แต่แบ่งช่วงของการผลิตต่างๆ ออกเป็นโซน และแต่ละโซนการผลิตมีระยะห่างกันประมาณ 25 เมตร (ภาพที่ 2) โรงเรือนสุกรแม่พันธุ์มีพื้นที่แยกออกจากโรงเรือนสุกรอนุบาลและสุกรขุน และโรงเรือนสุกรอุ้มท้องแยกอยู่คนละหลังกับโรงเรือนสุกรเลี้ยงลูก

โรงเรือนสุกรอนุบาลและสุกรขุน เป็นโรงเรือนแบบเปิด บรรจุสุกรได้ 500 – 600 ตัวต่อหนึ่งโรงเรือน ใช้ระบบการเลี้ยงแบบเข้า-หมด ออก-หมด (All-in all-out) เป็นรายสัปดาห์ เพื่อสามารถนำสุกรทั้งสัปดาห์การผลิตเข้าเลี้ยงได้ภายในหนึ่งโรงเรือนทุกโรงเรือนเพื่อลดการถ่ายเชื้อระหว่างชุด และย้ายไปโรงเรือนสุกรขุนเมื่อสุกรอายุครบ 8 สัปดาห์



ภาพที่ 2 แสดงแผนผังฟาร์มที่ดำเนินการวิจัย

ก่อนดำเนินงานวิจัย ฟาร์มมีระบบควบคุมโรคพีอาร์อาร์เอสโดยใช้ระบบฝูงปิด (Closed herd system) ในการทดแทนสุกรสาว (replacement gilts) และมีอัตราการทดแทนที่ 40 เปอร์เซนต์ต่อปี สุกรสาวทดแทนเป็นสุกรสาวที่ผลิตทดแทนเองภายในฟาร์ม (internal replacement gilts) และปรับสภาพสุกรสาวทดแทนก่อนเข้าฝูง (gilt acclimatization) โดยแม่สุกรนางท้องแก่คัดทิ้ง และดำเนินการปรับสภาพสุกรสาวทดแทนก่อนนำเข้าฝูงสุกรแม่พันธุ์ ในโรงเรือนที่ได้รับการออกแบบโดยเฉพาะเพื่อให้มีระบบการปรับสภาพและการพักฟื้นอย่างเพียงพอ นอกจากนั้นฟาร์มยังใช้ระบบการแยกเลี้ยงแม่สุกรท้องแรก (Parity segregation system) เพื่อควบคุมโรคพีอาร์อาร์เอส

ฟาร์มพบปัญหาการระบาดของโรคพีอาร์อาร์เอสในช่วงปลายเดือนมกราคม พ.ศ. 2553 พบว่าอัตราการแท้งของแม่สุกรเพิ่มขึ้นเป็นประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ สุกรอนุบาลจากเดิมที่มีอัตราการตายและคัดทิ้งรวมแล้วไม่เกิน 3 เปอร์เซ็นต์ต่อชุด เพิ่มขึ้นเป็นมากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ต่อชุด เมื่อทำการสุ่มเก็บตัวอย่างเลือดในเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2553 จากสุกรแม่พันธุ์ลำดับท้องละ 5 ตัวอย่าง และสุกรขุนที่ช่วงอายุ 4 6 8 12 16 18 และ 24 สัปดาห์ ช่วงอายุละ 5 ตัวอย่าง มาแยกซีรั่มและตรวจวัดระดับแอนติบอดี้ด้วยวิธีอีไลซ่า (HerdChek PRRS 2XR, IDEXX Laboratories, Westbrook, Maine, USA) พบว่าแม่สุกรแต่ละลำดับท้องในช่วงที่พบการระบาดของโรคพีอาร์อาร์เอส มีระดับระดับแอนติบอดี้ระหว่าง 2.1 – 2.8 และพบ seroconversion ที่สุกรอายุประมาณ 5 – 6 สัปดาห์ และเมื่อนำตัวอย่างซีรั่มในแต่ละช่วงอายุมารวม (pool)

และตรวจหาไวรัสในกระแสเลือดโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (Polymerase chain reaction, PCR) พบว่าให้ผลบวกทุกตัวอย่างในสุกรอนุบาลและขุน และพบจำนวน 2 ใน 5 ตัวอย่างจากส่วนแม่พันธุ์

หลังเกิดการระบาดของโรคพีอาร์อาร์เอส ฟาร์มดำเนินการฉีดวัคซีนโรคพีอาร์อาร์เอสชนิดเชื้อเป็น (Ingelvac PRRS MLV, Boehringer Ingelheim, USA) เพื่อควบคุมโรค โดยช่วงแรกดำเนินการฉีดวัคซีนแบบปูพรม (Mass vaccination) ในสุกรแม่พันธุ์ทุกตัว โดยเริ่มฉีดเข็มแรกในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ 2553 และทำการฉีดกระตุ้นซ้ำ (booster) สุกรสาวทดแทนและสุกรแม่พันธุ์ทุกตัวเมื่อครบ 1 เดือนในเดือนมีนาคม 2553 และหลังจากนั้นอีกทุกๆ 3 เดือน และฉีดวัคซีนชนิดเดียวกัน (Ingelvac PRRS MLV, Boehringer Ingelheim, USA) แบบโปรแกรมในลูกสุกรอายุ 10 – 14 วัน และสุกรสาวทดแทนทุกตัวก่อนเข้าฝูงจำนวน 2 ครั้งห่างกัน 1 เดือน (อายุ 18 และ 22 สัปดาห์) ในช่วงปรับสภาพ (acclimatization)

การเก็บตัวอย่างซีรั่ม

เก็บตัวอย่างซีรั่มก่อนและหลังการฉีดวัคซีนพีอาร์อาร์เอสชนิดเชื้อเป็น (Ingelvac PRRS MLV, Boehringer Ingelheim, USA) จำนวน 8 ครั้ง จากสุกร 4 กลุ่มอายุ กลุ่มอายุละ 5 ตัวอย่าง

- สุกรสาวทดแทน อายุ 16 – 28 สัปดาห์ จำนวน 5 ตัวอย่าง
- ลูกสุกรอายุ 2 – 3 สัปดาห์ จำนวน 5 ตัวอย่าง
- สุกรอนุบาล อายุ 4 – 8 สัปดาห์หลังหย่านม จำนวน 5 ตัวอย่าง
- สุกรขุน อายุ 12 – 18 สัปดาห์ จำนวน 5 ตัวอย่าง

ทำการเก็บ 3 ครั้งก่อนฉีดวัคซีน (พฤศจิกายน – ธันวาคม 2552 และมกราคม 2553) และอีก 6 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 1 เดือน โดยเก็บทุกเดือนต่อเนื่องกัน 6 เดือน (มีนาคม ถึง สิงหาคม 2553) และอีก 2 ครั้ง ในเดือน ตุลาคม และ ธันวาคม 2553 โดยสุกร 4 กลุ่มประกอบด้วย

การตรวจสอบไวรัส

แบ่งตัวอย่างซีรั่มแต่ละตัวอย่างออกเป็น 2 ส่วน เก็บตัวอย่างซีรั่มส่วนแรกสำรองไว้ที่ตู้แช่เย็นอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส และนำส่วนที่สองประมาณ 200 ไมโครลิตรมาตรวจหาเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสโดยวิธี Virus isolation โดยแยกเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ MARC 145 (Kim et al., 1993) ใน 96-well plate ที่มีเซลล์เจริญอยู่ประมาณ 80% ของพื้นที่ และบ่มในตู้อบ 37 องศาเซลเซียส 5% คาร์บอนไดอ๊อกไซด์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MEM ที่มี 2% FBS (Fetal bovine serum) เป็นเวลา 3 วัน จึงนำมาตรวจสอบผลการแยกเชื้อไวรัสด้วยวิธี IPMA และย้อมสีโดยใช้ Conjugate antibody HRP (Horseradish Peroxidase) หลังจากนั้นจึงนำตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อไวรัสไปตรวจสอบจีโนไทป์โดยวิธี RT-PCR

ปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เลส Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)

นำตัวอย่างที่ให้ผลบวกแต่ละตัวอย่างมาตรวจสอบสายพันธุ์ (Genotype) โดยวิธี**ป**ฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เลส (RT-PCR) แบบ Two step RT-PCR และใช้ไพรเมอร์ (Primers) ที่มีความจำเพาะต่อส่วนโอออาร์เอฟห้า เริ่มต้นโดยย่อด้วยการสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมดจากตัวอย่างซีรั่ม ด้วยชุดสกัด Trizol (Molecular Research Center Inc., USA) จากนั้นนำตัวอย่างอาร์เอนเอที่สกัดได้มาสังเคราะห์เป็น cDNA โดยใช้ชุดสังเคราะห์สำเร็จรูป (RevertAid Premium First Strand cDNA SYNTHESIS Kit, Fermentas Life Sciences, Canada) และใช้ปฏิกิริยาเริ่มต้นที่ 42 องศาเซลเซียส 60 นาที ตามด้วย 95 องศาเซลเซียส 10 นาที

นำ cDNA ที่สังเคราะห์ได้มาผ่านขบวนการ**ป**ฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เลส เพื่อตรวจสอบโอออาร์เอฟห้าต่อสองจีโนไทป์ ด้วย Primers ที่จำเพาะกับเชื้อไวรัส สายพันธุ์ยุโรป (Forward TGA GGT GGG CTA CAA CCA TT , Reward AGG CTA GCA CGA GCT TTT GT) และสายพันธุ์อเมริกาเหนือ (Forward CCT GAG ACC ATG AGG TGG G , Reward TTT AGG GCA TAT ATC ATC ACT GG) **ป**ฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เลสของเชื้อไวรัสสายพันธุ์ยุโรป ใช้ปฏิกิริยาเริ่มต้น 95 องศาเซลเซียส 4 นาที (initial denaturation) ตามด้วย 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที (denaturation) 55 องศาเซลเซียส 45 วินาที (annealing) 72 องศาเซลเซียส 60 วินาที (extension) จำนวน 35 รอบ และสิ้นสุดด้วย 72 องศาเซลเซียส 5 นาที (Final extension) ให้ผลผลิต**ป**ฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เลส (PCR products) ขนาด 702 ลำดับเบส (base pair, bp) ส่วน**ป**ฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เลสของเชื้อไวรัสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ ใช้ปฏิกิริยาเริ่มต้น 95 องศาเซลเซียส 4 นาที ตามด้วย 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที 72 องศาเซลเซียส 45 วินาที จำนวน 35 รอบ และสิ้นสุดด้วย 72 องศาเซลเซียส 5 นาที ให้ผลผลิต**ป**ฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เลส (PCR products) ขนาด 763 ลำดับเบส

การถอดรหัสพันธุกรรมยีน ORF5

นำผลผลิต**ป**ฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เลส (ORF5 PCR product) มาตรวจสอบใน agarose gel 1.5% ที่กระแสไฟฟ้า 100 volt 30 นาที แยกชิ้นส่วนโอออาร์เอฟห้าดีเอ็นเอบริสุทธิ์จาก agarose gel 1.5% โดยชุดสกัดสำเร็จรูป (NucleoSpin Purify Kits, Clontech Laboratories Inc, USA) เชื่อมต่อ (Ligation) เข้าไปยัง พลาสมิดพาหะ (Plasmid) โดยใช้ pGEM-T Easy Vector (Promega, USA) และทำปฏิกิริยาตามคู่มือที่แนบมา โดยบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ได้พลาสมิดที่มีชิ้นส่วนโอออาร์เอฟห้าดีเอ็นเอ จึงทำการ Transformation ไปยัง E.coli สายพันธุ์ JM109 โดยวิธี Heat Shock 42 องศาเซลเซียส 60 วินาทีตามด้วยอยู่ในน้ำแข็ง 2 นาที นำไปเลี้ยงเพิ่มจำนวนในอาหารเหลว (LB broth) 800 มิลลิลตรที่มียาปฏิชีวนะชนิดแอมฟิซิริน(100 ไมโครกรัมต่อ 1 มิลลิลิตร)ในตู้อบแบบเขย่า37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยง 5000 รอบ 5 นาที ทิ้ง LB Media ส่วนบน (Supernatant) ให้เหลือ LB Media อยู่รวมกับตะกอนจำนวน 100 ไมโครลิตรทำให้ตะกอนแขวนลอย (Resuspend) ด้วย micropipett นำมาเขี่ยกระจายเชื้อใน LB Media ที่มียาปฏิชีวนะแอมฟิซิริน (100 ไมโครกรัมต่อ 1 มิลลิลิตร), เอ็กซ์กอล (Xgal) ขนาด 400 ไมโครกรัม และ ไอพีทีจี (IPTG)ขนาด 1000 ไมโครกรัม อบข้ามคืน 37 องศาเซลเซียส ทำการแยกโคโลนีเดี่ยว (single

colony) สีขาวเพราะจะมีส่วนของยีนที่ต้องการของเราอยู่ในพลาสมิด ส่วนโคโลนีสีฟ้าจะไม่มียีนของเรา เนื่องจากเอนไซม์กาแลคโตซิเดสทำงานโดยการเปลี่ยนสารเอ็กซ์กอลเป็นสีฟ้า (Selection marker) จำนวน 5 โคโลนีต่อหนึ่งตัวอย่างแต่ละโคโลนีทำการเพิ่มจำนวนใน LB broth 3 มิลลิลิตรด้วยการเขย่าในตู้อบ 37 องศา ข้ามคืน จากนั้นทำการสกัดพลาสมิดพาหะ ที่มีชิ้นส่วนโออาร์เอฟห้าดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป (NucleoSpin Plasmid Kits, Clontech Laboratories Inc, USA) ส่งถอดรหัสลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง Automated DNA sequencer

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลรหัสพันธุกรรมมาตัดรหัสเฉพาะส่วน ORF5 โดยเริ่มจากโคดอนเริ่มต้น (start codon; ATG) ถึงโคดอนสิ้นสุด (stop codon; TAG) โดยโปรแกรม Chromas และนำรหัสพันธุกรรมที่ตัดได้มาตรวจสอบความถูกต้องโดยเทียบกับยีนของไวรัสต้นแบบสายพันธุ์ยุโรป Lelystad virus (LV) (Genbank Accession number M96262) และสายพันธุ์อเมริกาเหนือ VR-2332 (Genbank Accession number U87392) นำข้อมูลทั้งหมดของสายพันธุกรรมมาจัดเรียง (multiple alignment) โดยโปรแกรม Clustal W (Thompson et al., 1994) จากนั้นนำมาวิเคราะห์ nucleotide และ amino acid similarities ด้วยโปรแกรม Bioedit และทำการวิเคราะห์สายพันธุกรรมของเชื้อในกลุ่มประชากรเดียวกันทั้งช่วงเวลาเดียวกันและต่างช่วงเวลากัน โดยใช้ phylogenetic relationships ด้วยโปรแกรม MEGA 5 โดยใช้วิธี Neighbor-Joining ค่า Bootstrap test คำนวณจาก 1000 replicates ซึ่งแสดงอยู่ที่แต่ละกิ่ง คำนวณ Evolutionary distances ด้วยคอมพิวเตอร์ โดยใช้วิธี Kimura 2-parameter การจัดการ gap ใช้วิธี Pairwise deletion option และตรวจสอบการผสมข้ามสายพันธุ์ (recombination) โดยใช้โปรแกรม SimPlot

ส่วนที่ 2 การเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอ

นำเชื้อไวรัสแยกได้มาเพิ่มจำนวนในเซลล์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (MARC145, ATCC) สกัดอาร์เอ็นเอจากเชื้อไวรัสที่แยกได้ โดยใช้ชุดสกัดอาร์เอ็นเอสำเร็จรูป นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจหา RNA ของเชื้อไวรัสด้วยวิธี ปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส โดยเปลี่ยนส่วนอาร์เอ็นเอที่สกัดได้เป็น cDNA และนำ cDNA ที่ได้ มาทำปฏิกริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสที่มีความจำเพาะต่อยีนORF 5 ของเชื้อไวรัส นำผลิตภัณฑ์ปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอร์ (PCR product) มาทำให้บริสุทธิ์เพื่อให้ได้ส่วนพันธุกรรมของยีน ORF5

นำส่วนพันธุกรรมของยีน ORF 5 ที่แยกได้ มาเตรียมเป็น plasmid DNA โดยนำส่วนยีน ORF5 มาโคลนเข้า transfer vector ตัดยีนส่วนที่ต้องการโดยใช้เอ็มไซม์ (restricted enzymes) และนำยีนส่วนตัดมา insert เข้า eukaryotic expression plasmid นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่เตรียมได้มาทำให้บริสุทธิ์และพัฒนาเป็นดีเอ็นเอวัคซีนที่แทรก PADRE (Alexander et al., 2000; del Guercio et al., 1997)

การเตรียมยีน ORF5 ของเชื้อไวรัสPRRS

นำเชื้อไวรัสที่แยกได้มาเพิ่มจำนวนในเซลล์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (MARC145, ATCC) สกัดอาร์เอ็นเอจากเชื้อไวรัสที่แยกได้ โดยใช้ชุดสกัดอาร์เอ็นเอสำเร็จรูป นำอาร์เอ็นเอที่สกัดมาทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบย้อนกลับ (reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR) โดยเปลี่ยนอาร์เอ็นเอที่สกัดได้เป็น cDNA และนำ cDNA ที่ได้ มาทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่มีความจำเพาะต่อยีน ORF5 ของเชื้อไวรัส นำผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR product) มาทำให้บริสุทธิ์เพื่อให้ได้ส่วนพันธุกรรมของยีน GP5 และทำการตรวจสอบลำดับเบส เพื่อนำมาวิเคราะห์และออกแบบไพรเมอร์ในส่วนยีน GP5 ในตำแหน่งที่ 33 aa กับ 34 aa โดยออกแบบให้มีลำดับเบสของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ส่วนปลายของยีน GP5 ด้าน 5’ เป็น *Kpn* I และปลาย 3’ เป็น *Not* I

การเตรียมพลาสมิด DNA

นำส่วนพันธุกรรมของยีนGP5 ที่แยกได้ มาเตรียมเป็นพลาสมิดDNAโดยนำยีน GP5 ที่ได้ทำการการแทรกยีน PADRE มาโคลนเข้า pET28 ตรวจสอบการแทรกของยีนโดยทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเปรียบเทียบกับยีน GP5 ที่ไม่มีการแทรกยีน PADRE เมื่อพบว่ามีความแตกต่างของขนาด PCR productจึงตัดยีนส่วนที่ต้องการ คือมีการแทรกของยีน PADREด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ(restricted enzymes) *Kpn* I และ *Not* I และนำยีนส่วนตัดมา insert เข้า pcDNA 3.1/CT-GFP-TOPOซึ่งเป็น eukaryotic expression plasmidดังภาพที่ 1นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่เตรียมได้มาทำให้บริสุทธิ์ จากนั้นทำการตรวจสอบสำดับเบส เมื่อลำดับเบสถูกต้องนำจึงไปพัฒนาเป็นดีเอ็นเอวัคซีนต่อไป (Alexander et al., 2000; del Guercio et al., 1997)

บทที่ 4
ผลการทดลอง

ส่วนที่ 1 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสภายในฟาร์ม

จำนวนตัวอย่าง

จากการเก็บตัวอย่างเลือดสุกรสาวทดแทน ลูกสุกรดูดนม สุกรอนุบาล และสุกรขุน ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2552 ถึง ธันวาคม พ.ศ. 2553 สามารถถอดรหัสสายพันธุกรรมส่วนโอออาร์เอฟห้าของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสทั้งสองสายพันธุ์ได้จำนวนรวมทั้งสิ้น 277 ตัวอย่าง แบ่งออกเป็นเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรปจำนวน 145 ตัวอย่างและสายพันธุ์อเมริกาเหนือจำนวน 132 ตัวอย่าง

เมื่อนำสายรหัสพันธุกรรมส่วนโอออาร์เอฟห้าของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสทั้งสองสายพันธุ์มาจัดเรียงตามลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน พบว่าเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่แยกได้มีความหลากหลายในสายรหัสพันธุกรรม และพบการกลายพันธุ์ชนิดการทดแทนส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ (Substitution mutation) แต่อย่างไรก็ตามพบว่ามีบางสายรหัสพันธุกรรมที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน มีความเหมือนกัน 100% ดังนั้นการวิเคราะห์โดยวิธีแขนงกิ่งไม้ (Phylogenetic tree analysis) จึงมีความจำเป็นต้องคัดสายรหัสพันธุกรรมที่มีความเหมือนกันทั้งหมดออกจากการวิเคราะห์ เหลือไว้เพียง 1 สายรหัสพันธุกรรมที่เป็นตัวแทนในการวิเคราะห์ และจากการคัดออกพบว่าคงเหลือรหัสพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรปที่มีความต่างจำนวน 63 จากทั้งหมด 145 ตัวอย่าง และรหัสพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือที่มีความต่างกันจำนวน 33 จากทั้งหมด 132 ตัวอย่าง นำรหัสพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่แยกได้ฝากไว้ GenBank ภายใต้ accession numbers JQ040720–JQ040771 สำหรับเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรป และ JQ040772–JQ040797 สำหรับเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ

วิเคราะห์โดยวิธีแขนงกิ่งไม้

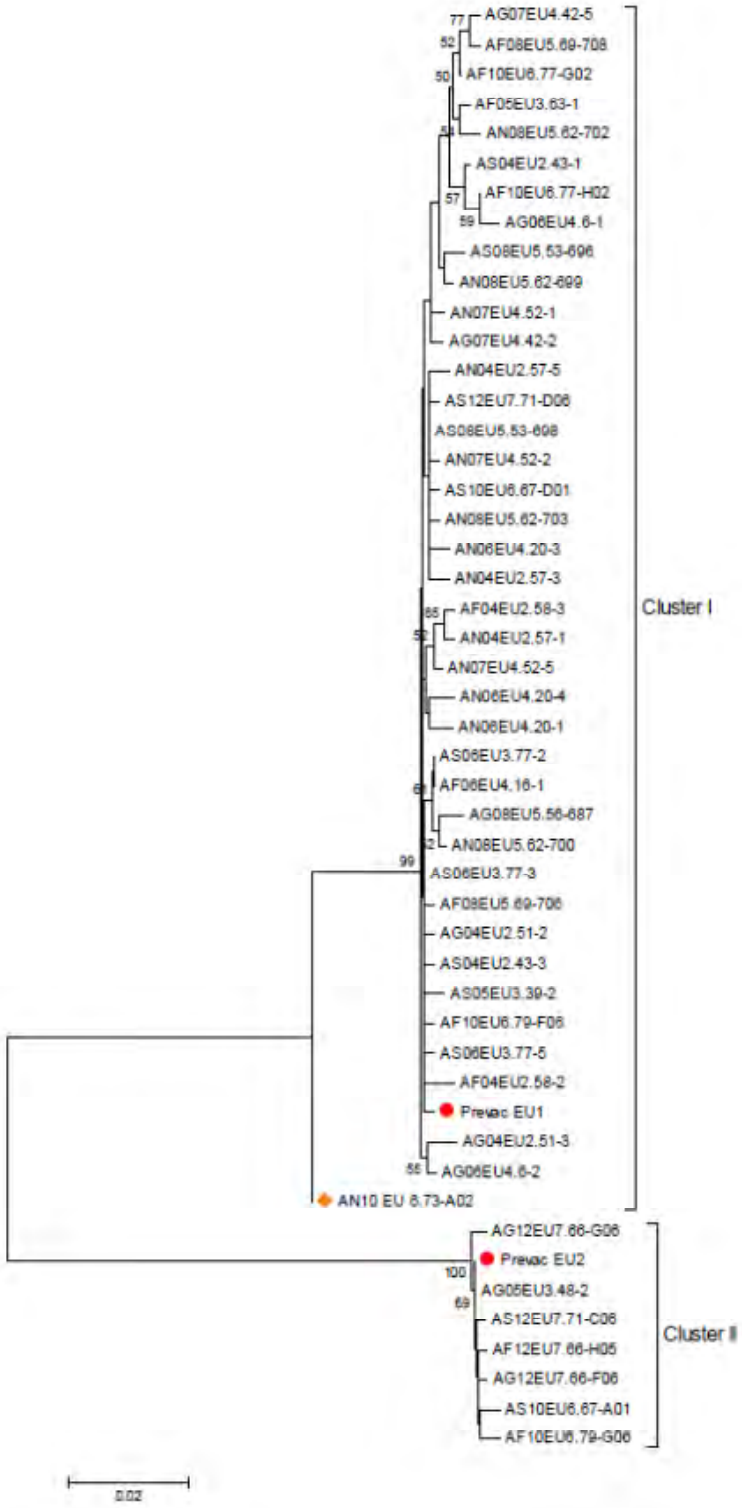
นำสายรหัสพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสส่วนโอออาร์เอฟห้าของทั้งสายพันธุ์ยุโรปและสายพันธุ์อเมริกาเหนือ ที่ต่างกันทั้งหมดมาทำการวิเคราะห์ โดยวิธีแขนงกิ่งไม้ (Phylogenetic tree) โดยการวิเคราะห์ได้แยกการวิเคราะห์ของแต่ละสายพันธุ์ออกจากกัน ในการวิเคราะห์ของสายพันธุ์ยุโรป ได้นำรหัสพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรปจำนวน 2 ไอโซเลตที่แยกได้ก่อนฉีดวัคซีน (ไอโซเลต Prevac EU 1 และ Prevac EU 2) มารวมในการวิเคราะห์ ในขณะที่การวิเคราะห์ของสายพันธุ์อเมริกาเหนือ ได้นำรหัสพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือจำนวน 1 ไอโซเลต (Prevac US 1) ที่แยกได้ก่อนฉีดวัคซีนและรหัสพันธุกรรมของวัคซีนพีอาร์อาร์เอสชนิดเชื้อเป็น (Ingelvac PRRS MLV®, Boehringer Ingelheim, USA) ที่มี Accession number AF066183 มารวมในการวิเคราะห์

จากการวิเคราะห์โดยวิธี Phylogenetic analysis พบว่าสามารถแบ่งเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรปที่ตรวจพบออกได้เป็น 2 คลัสเตอร์ (ภาพที่ 3) โดยไวรัสทั้งหมดมีเปอร์เซนต์ความเหมือน (% homology) ส่วนนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของไวรัสภายในคลัสเตอร์ที่ 85.9-86.7% และ 85.0-86.5% ตามลำดับ เมื่อทำการวิเคราะห์เพิ่มเติมพบว่าไวรัสในคลัสเตอร์ที่ 1 มีเปอร์เซนต์ความเหมือน (% homology) ส่วนนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของไวรัสภายในคลัสเตอร์ที่ 85.9-86.7% และ 85.0-86.5% ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ส่วนไวรัสในคลัสเตอร์ที่ 2 มีเปอร์เซนต์ความเหมือนส่วนนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของไวรัสภายในคลัสเตอร์ที่ 85.9-86.7% และ 85.0-86.5% ตามลำดับ นอกจากนั้นพบว่าไวรัสในคลัสเตอร์ที่ 1 และ 2 มีเปอร์เซนต์ความเหมือนส่วนนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน 85.9-86.7% และ 85.0-86.5% ตามลำดับ และตลอดการดำเนินงานวิจัยพบว่าพบเชื้อไวรัสทั้งสองคลัสเตอร์นี้เท่านั้นในฝูงสุกรตั้งแต่ก่อนฉีดวัคซีนจนถึงสิ้นสุดการเก็บตัวอย่างในเดือนธันวาคม 2553 ส่วนไวรัสสายพันธุ์ยุโรปที่แยกได้ก่อนฉีดวัคซีน ไอโซเลต Prevac EU พบอยู่คลัสเตอร์ที่ 1 และ ไอโซเลต Prevac EU 2 พบอยู่ในคลัสเตอร์ที่ 2 และหลังฉีดวัคซีนพบไวรัสคลัสเตอร์ที่ 1 ทุกเดือน และ คลัสเตอร์ที่ 2 เริ่มพบในเดือนที่ 5 จนสิ้นสุดการเก็บตัวอย่าง

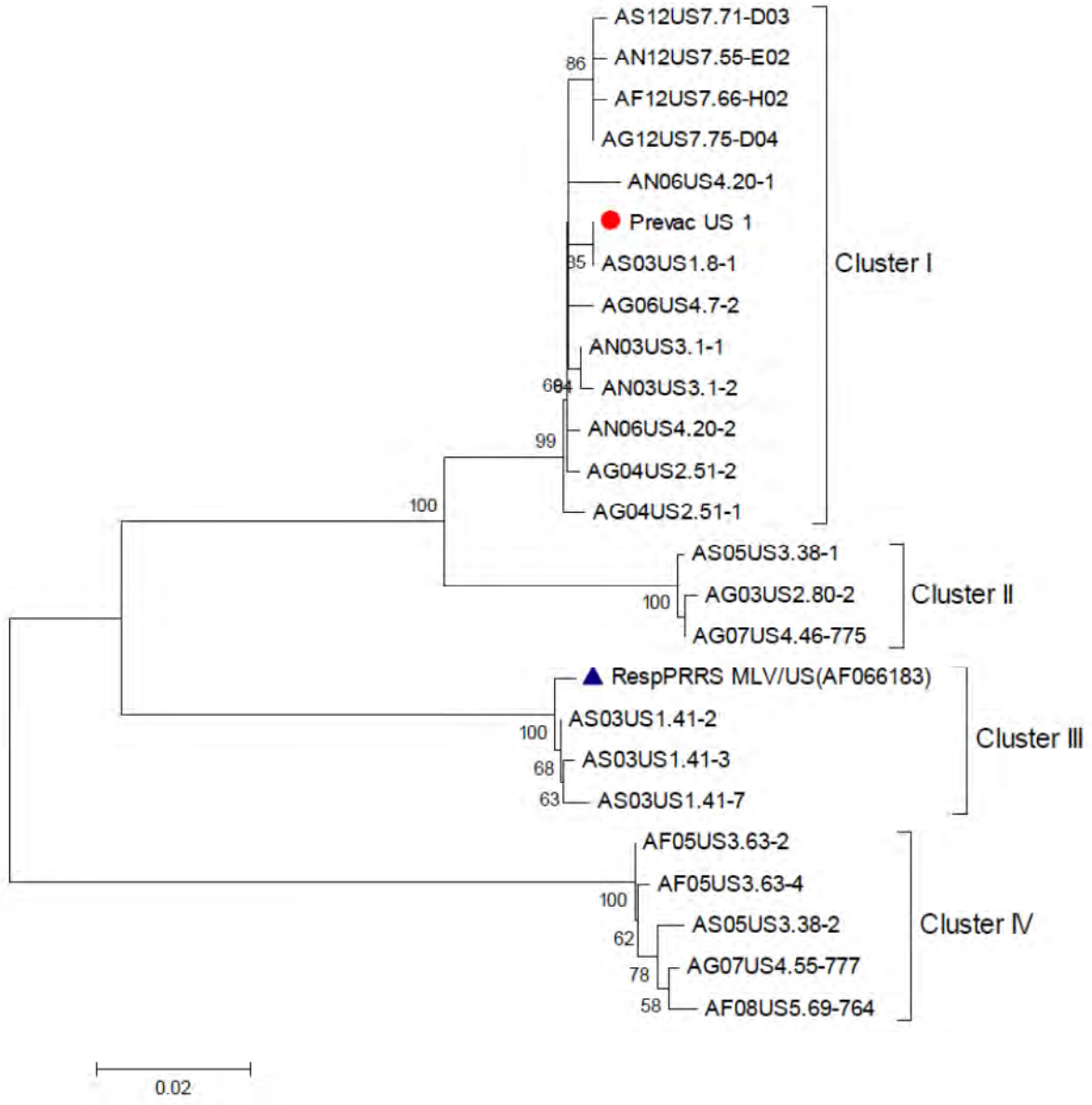
สำหรับเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ จากการวิเคราะห์โดยวิธี Phylogenetic analysis พบว่าสามารถแบ่งเชื้อไวรัสสายพันธุ์อเมริกาเหนือออกได้เป็น 4 คลัสเตอร์ (ภาพที่ 4) โดยไวรัสทั้งหมดมีเปอร์เซนต์ความเหมือน (% homology) ส่วนนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของไวรัสภายในคลัสเตอร์ที่ 85.9-86.7% และ 85.0-86.5% ตามลำดับ เมื่อทำการวิเคราะห์เพิ่มเติมพบว่าไวรัสในคลัสเตอร์ที่ 1 มีเปอร์เซนต์ความเหมือน (% homology) ส่วนนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของไวรัสภายในคลัสเตอร์ที่ 85.9-86.7% และ 85.0-86.5% ตามลำดับ (ตารางที่ 2) และไวรัสที่แยกได้ก่อนฉีดวัคซีน (ไอโซเลต Prevac US 1) ถูกจัดอยู่ในคลัสเตอร์ที่ 1 ส่วนไวรัสในคลัสเตอร์ที่ 2 มีเปอร์เซนต์ความเหมือนส่วนนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของไวรัสภายในคลัสเตอร์ที่ 85.9-86.7% และ 85.0-86.5% ตามลำดับ ไวรัสในคลัสเตอร์ที่ 3 มีเปอร์เซนต์ความเหมือน (% homology) ส่วนนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของไวรัสภายในคลัสเตอร์ที่ 85.9-86.7% และ 85.0-86.5% ตามลำดับ เป็นที่น่าสังเกตุว่าวัคซีนพีอาร์อาร์เอสชนิดเชื้อเป็น (Ingelvac PRRS MLV®, Boehringer Ingelheim, USA) ที่ใช้ในการทดลองถูกจัดอยู่ในคลัสเตอร์นี้ด้วยและไวรัสที่แยกได้จากการทดลองที่ถูกจัดอยู่ในคลัสเตอร์ที่ 3 มีเปอร์เซนต์ความเหมือนส่วนนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนวัคซีนพีอาร์อาร์เอสชนิดเชื้อเป็นที่ 85.9-86.7% และ 85.0-86.5% ตามลำดับ ส่วนไวรัสในคลัสเตอร์ที่ 4 มีเปอร์เซนต์ความเหมือนส่วนนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของไวรัสภายในคลัสเตอร์ที่ 85.9-86.7% และ 85.0-86.5% ตามลำดับ

เชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือในคลัสเตอร์ที่ 1 พบว่าเป็นเชื้อไวรัสที่แยกได้บ่อยที่สุดและเป็นคลัสเตอร์ที่พบตั้งแต่ก่อนฉีดวัคซีนเชื้อเป็นพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง ส่วนคลัสเตอร์ที่ 2 พบเล็กน้อยในเดือนที่ 3, 5 และ 7 จำนวน 5 ใน 103 ตัวอย่าง (ภาพที่ 4) ส่วนคลัสเตอร์ที่ 3 พบว่ามีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนกับวัคซีนเชื้อเป็นพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ (Ingelvac PRRS MLV, Boehringer Ingelheim, USA) ที่ฉีดในฟาร์มโดยพบเฉพาะลูกหมูดูด

นม ตรวจพบในเดือนที่ 3 เท่านั้น หลังจากนั้นไม่สามารถตรวจพบ และคลัสเตอร์ที่ 4 เริ่มพบในเดือนที่ 5 จนสิ้นสุดการเก็บตัวอย่าง ส่วนไวรัสก่อนฉีดวัคซีน (Prevac US 1) พบว่าอยู่ในคลัสเตอร์ที่ 1



ภาพที่ 3 แสดงแขนงกิ่งไม้ (Phylogenetic tree) ของยีนโออาร์เอฟห้าของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์สายพันธุ์ยุโรป ที่แบ่งไวรัสออกเป็น 2 คลัสเตอร์ประกอบด้วยคลัสเตอร์ 1 และ 2 โดยวงกลมสีแดงแสดงถึงไวรัสในคลัสเตอร์ที่แยกได้ตั้งแต่ก่อนฉีดวัคซีน (Prevac EU 1 และ Prevac EU 2)



ภาพที่ 4 แสดงแขนงกิ่งไม้ (Phylogenetic tree) ของยีนโออาร์เอฟห้าของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์สายพันธุ์อเมริกาเหนือ ที่แบ่งไวรัสออกเป็น 4 คลัสเตอร์ประกอบด้วยคลัสเตอร์ 1 2 3 และ 4 โดยวงกลมสีแดงแสดงถึงไวรัสในคลัสเตอร์ที่แยกได้ตั้งแต่ก่อนฉีดวัคซีน (Prevac US 1) และสามเหลี่ยมสีน้ำเงินแสดงถึงวัคซีนพีอาร์อาร์เอสชนิดเชื้อเป็นที่ใช้ในการฉีดฝูงสุกร

ตารางที่ 1 แสดงความเหมือนส่วนนิวคลีโอไทด์ (ตัวอักษรธรรมดา) และกรดอะมิโน (ตัวอักษรเอียงเข้ม) ของยีนโออาร์เอฟห้าของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรป

นิวคลีโอไทด์ \ ***กรดอะมิโน***	คลัสเตอร์ 1	คลัสเตอร์ 2
คลัสเตอร์ 1	98.5-100% \ ***94.5-100%***	***85.0-86.5%***
คลัสเตอร์ 2	85.9-86.7%	99.5-100% \ ***98.5-100%***

ตารางที่ 2 แสดงความเหมือนส่วนนิวคลีโอไทด์ (ตัวอักษรธรรมดา) และกรดอะมิโน (ตัวอักษรเอียงเข้ม) ของยีนโออาร์เอฟห้าของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ

นิวคลีโอไทด์ \ ***กรดอะมิโน***	คลัสเตอร์ 1	คลัสเตอร์ 2	คลัสเตอร์ 3	คลัสเตอร์ 4
คลัสเตอร์ 1	99.5-100% ***99..5-100%***	***89.0-90.0%***	***85.5-86.0%***	***85.5-87.0%***
คลัสเตอร์ 2	88.5-89.5%	99-100% \ ***98-100%***	***91.5-94.0%***	***86.0-88.0%***
คลัสเตอร์ 3	88.3-88.5%	95.0-95.5%	99.6-100% ***99-100%***	***83.5-85.5%***
คลัสเตอร์ 4	85.5-86.5%	85.2-86.5%	84.2-85.0%	99.1-100% ***98-100%***

ตารางที่ 3 แสดงจำนวนไวรัสที่แยกในแต่ละเดือนในแต่ละคลัสเตอร์ของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรป

กลุ่มสุกร	คลัสเตอร์	เดือน							
		3	4	5	6	7	8	10	12
สุกรดูดนม	1	3	4	6	4	-	5	1	1
	2	-	-	-	-	-	-	3	2
สุกรอนุบาล	1	2	4	3	3	3	5	2	-
	2	-	-	-	-	-	-	3	4
สุกรขุน	1	-	1	1	10	-	5	4	-
	2	-	-	-	2	-	-	2	4
สุกรสาวทดแทน	1	6	4	1	4	4	1	-	-
	2	-	-	1	-	1	-	-	4
รวม	-	11	13	12	23	8	16	15	15

ตารางที่ 4 แสดงจำนวนไวรัสที่แยกในแต่ละเดือนในแต่ละคลัสเตอร์ของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ

กลุ่มสุกร	คลัสเตอร์	เดือน									
		3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
สุกรดูดนม	1	3	6	2	-	1	-	-	-	-	3
	2	-	-	2	-	1	-	-	-	-	-
	3	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	2	-	1	4	-	4	-	1
สุกรอนุบาล	1	5	1	-	2	4	2	-	1		7
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-
สุกรขุน	1	-	2	-	2	-	-	-	3	-	4
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	6	-	-	5	-	-	-	-
สุกรสาวทดแทน	1	4	5	-	2	1	-	-	-	-	4
	2	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-
รวม	-	20	14	12	8	11	11	-	8	-	19

การจัดกลุ่มของไวรัสและการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม

จากการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนจากการจัดกลุ่มโดยวิธีแขนงกิ่งไม้ (Phylogenetic tree) และวิเคราะห์ตำแหน่ง decoy epitope A และ primary neutralizing epitope B ที่ยีนโออาร์เอฟห้าของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสทั้งสองสายพันธุ์ จากประมาณตำแหน่งที่ 27 ถึง 48 ทางด้าน N-terminal และตำแหน่ง N-linked glycosylation พบว่าเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสในแต่ละคลัสเตอร์จะมีตำแหน่งส่วนนี้ที่เหมือนกัน ทำให้สามารถแบ่งรูปแบบเชื้อไวรัสตามลักษณะของ decoy epitope A และ primary neutralizing epitope B ได้สอดคล้องกับการแบ่งที่ได้จากการวิเคราะห์โดยแขนงกิ่งไม้ ส่วนสายพันธุ์ยุโรปแบ่งได้ 2 รูปแบบ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่ง decoy epitope A และ primary neutralizing epitope B ของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรป (ภาคผนวก 1) โดยไวรัสทั้ง 2 คลัสเตอร์มี

N-linked glycosylation ที่ตำแหน่ง N^{37} ส่วนคลัสเตอร์ที่ 2 มี N-linked glycosylation เพิ่มเติมที่ตำแหน่ง N^{37} (ตารางที่ 5)

เมื่อใช้หลักการแบ่งแบบเดียวกันกับเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรป สามารถแบ่งไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือออกได้ 4 รูปแบบ (ตารางที่ 6 และภาคผนวก 2) ประกอบด้วย ^{30}NASNDS^{35}, ^{30}NASNTN^{35}, ^{30}DANNTS^{35} และ ^{30}SASNNS^{35} จากคลัสเตอร์ที่ 1 – 4 ตามลำดับ โดยพบการเปลี่ยนแปลงหลักที่ส่วน N-linked glycosylation ช่วงตำแหน่ง 30-35 ทางด้าน N-terminal การเกิด N-linked glycosylation พบว่าที่ตำแหน่ง N^{33} เหมือนกัน ทั้ง 4 กลุ่ม รวมทั้งวัคซีน ในกลุ่มที่ 1 และ กลุ่มที่ 2 พบที่ตำแหน่ง N^{30} เหมือนกันแต่กลุ่มที่ 2 พบเพิ่มอีก 1 ตำแหน่งที่ N^{35} และส่วนกลุ่มที่ 3 และ 4 พบเพิ่ม 1 ตำแหน่งที่ N^{32} และ N^{34} ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

นอกจากการแบ่งกลุ่มไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือออกได้ 4 กลุ่มตามรูปแบบของ decoy epitope A และ primary neutralizing epitope B แล้ว ยังพบว่าสามารถแบ่งไวรัสสายพันธุ์อเมริกาคลัสเตอร์ที่ 4 ออกได้เป็น 3 กลุ่มย่อย ประกอบด้วย SHLQLIYNL SHLLLSYNL และ SHLLLSCNL (ตารางที่ 6) ซึ่งความต่างทางพันธุกรรมของเชื้อทั้ง 3 รูปแบบนี้เป็นความแตกต่างที่ตำแหน่ง neutralizing epitope B

เป็นที่น่าสังเกตุว่าพบเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือที่เกิดการกลายพันธุ์ ได้ในกลุ่มประชากรลูกสุกรดูดนมเป็นกลุ่มประชากรแรกเสมอ (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 5 แสดงตำแหน่งการเกิด N-linked glycosylation ของไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรปและอเมริกาเหนือในคลัสเตอร์ต่างๆ

สายพันธุ์	**คลัสเตอร์ 1**	**คลัสเตอร์ 2**	**คลัสเตอร์ 3**	**คลัสเตอร์ 4**
ยุโรป	N^{35}	N^{35}, N^{37}	-	-
อเมริกาเหนือ	N^{30}, N^{33}	N^{30}, N^{33}, N^{35}	N^{32}, N^{33}	N^{33}, N^{34}

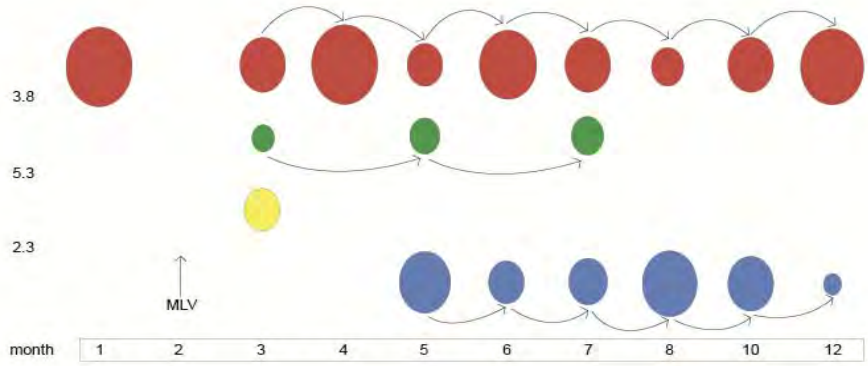
ตารางที่ 6 คลัสเตอร์และรูปแบบกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง decoy epitope A and neutralizing epitope B ของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ

คลัสเตอร์	รูปแบบที่	กรดอะมิโนตามรูปแบบ	เดือนที่เก็บตัวอย่าง							
			3	4	5	6	7	8	10	12
I	I	VLANASNTNSSHFQLIYNL	10	14	1	6	6	2	4	18
II	II	VLVDANNTSSSHFQLIYNL	1^{G}	-	-	-	$2^{G,S}$	-	-	-
III	III	VLANASNDSSSHLQLIYNL	7^{S*}	-	-	-	-	-	-	-
IV	IV-1	VLVSASNNSSSHLQLIYNL	-	-	-	2^{N}	-	$9^{F,S}$	4^{S}	1^{S}
IV	IV-2	VLVSASNNSSSHLLLSYNL	-	-	5^{S}	-	-	-	-	-
IV	IV-2	VLVSASNNSSSHLLLSCNL	-	-	-	-	$3^{G,S}$	-	-	-

*S ลูกสุกรดูดนม, G สุกรสาว, N ลูกสุกรอนุบาล, F สุกรขุน

การเปลี่ยนแปลงไวรัสภายในฝูง (Dynamic of PRRSV in a herd)

ก่อนการฉีดวัคซีนพีอาร์อาร์เอสชนิดเชื้อเป็นภายในฝูง พบว่ามีเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนืออยู่ 1 คลัสเตอร์ แต่มีไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรปอยู่ 2 คลัสเตอร์ แต่หลังจากมีการฉีดวัคซีนเชื้อเป็นสายพันธุ์อเมริกาเหนือพบว่าในสายพันธุ์อเมริกาเหนือกลับมีการเปลี่ยนแปลงที่มากกว่าสายพันธุ์ยุโรปโดยพบรวมทั้งหมด 4 คลัสเตอร์ แต่ในทางตรงข้ามยังพบไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรปอยู่ 2 คลัสเตอร์เท่าเดิมไม่เปลี่ยนแปลง โดยคลัสเตอร์ที่ 1 พบทั้งก่อนและหลังการฉีดวัคซีน ส่วนเดือนที่ 3 หลังการฉีดวัคซีนพบเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือคลัสเตอร์ที่ 3 ซึ่งไวรัสในคลัสเตอร์นี้มีความเหมือนในระดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนไวรัสวัคซีนถึง 99.5% แต่อย่างไรก็ตามพบว่า สามารถตรวจพบได้เพียงเดือนเดียว หลังจากนั้นก็ไม่พบตลอดการทดลอง ส่วนกลุ่มที่ 2 เริ่มพบในเดือนที่ 5 โดยพบอยู่ 2 – 3 เดือน หลังจากนั้นไม่พบตลอดการทดลอง แต่เริ่มพบคลัสเตอร์ที่ 4 ในเดือนที่ 5 หลังจากการฉีดวัคซีนและช่วงเวลาที่พบเป็นช่วงเวลาเดียวกับการเจอไวรัสในคลัสเตอร์ที่ 2 หลังจากนั้นก็พบตลอดจนสิ้นสุดการทดลองทั้งหมดทุกกลุ่ม



ภาพที่ 5 การเกิดขนาดของแต่ละกลุ่มไวรัสสายพันธุ์อเมริกาเหนือในแต่ละเดือน

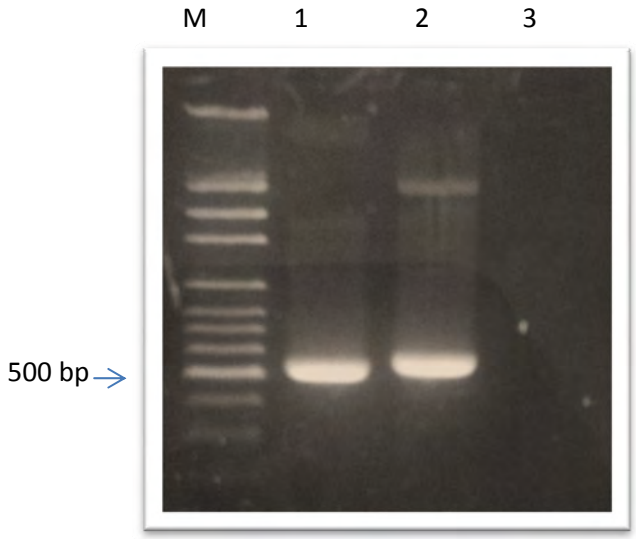
การผสมสารพันธุกรรมระหว่างไวรัส (Recombination)

เมื่อวิเคราะห์การผสมสารพันธุกรรมระหว่างไวรัส (recombination) ด้วยโปรแกรม Simplot ไม่พบว่ามีการผสมสารพันธุกรรมระหว่างไวรัส ทั้งการผสมสารพันธุกรรมระหว่างเชื้อไวรัสในสายพันธุ์เดียวกัน (Intragenotype recombination) หรือการผสมสารพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ (Intergenotype recombination)

ส่วนที่ 2 การเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอ

ผลการทดลอง

การตรวจสอบการแทรกของยีน PADRE ในยีนโออาร์เอฟห้า หลังจากการเชื่อมเข้ากับเวคเตอร์pET28 ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ต่อยีนโออาร์เอฟห้า ไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าขนาดของ PCR product ของโออาร์เอฟห้า ที่มียีน PADRE แทรกอยู่มีขนาดใหญ่กว่าเมื่อเปรียบเทียบกับยีนโออาร์เอฟห้าปกติดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 6 การตรวจสอบขนาด PCR product ของยีนGP5-PADREที่ได้จากการเตรียมรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วย 2% gel electrophoresis

ช่อง M คือ ladder

ช่อง1 คือพลาสมิดที่ไม่มียีนPADRE แทรกอยู่ใน GP 5

ช่อง2 คือพลาสมิดที่มียีน PADRE แทรกอยู่ใน GP 5

ช่อง 3 คือ ตัวอย่างควบคุมลบ

ผลการตรวจสอบลำดับเบสของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดpcDNA-GP5-PADRE พบว่ายีน PADRE แทรกอยู่ในตำแหน่งที่ 33 aaกับ 34 aaของยีน GP5 เปรียบเทียบกับลำดับเบสของ GP5 ที่ไม่ได้ insert PADREดังนี้

1. ลำดับเบสของ PADRE

GCCAAGTTCGTGGCTGCTGGACCCTGAAGGCTGCCGCT

2. ลำดับเบสของ PRRSV MLV GP5

ATGGTGGAGAAATGCTTGACCGCGGGCTGTTGCTCGCAATTGCTTTCTTTGTGGTGTATCGTGCCGTTCT

GTTTTGCTGTGCTCGCCAACGCCAGCAACGACAGCAGCTCC CATCTACAGCTGA

33aa 34aa

TTTACAACTTGACGCTATGTGAGCTGAATGGCACAGATTGGCTAGCTAACAAATTGATTGGGCAGTGGAG

AGTTTTGTCATCTTTCCCGTACTAACTCACATCATTTCCTATTGTGCTCTCACCACGAGCCATTTCCTTGA

TACAGTCGGTCTGGTTACTGTGTCCACCGCCGGGTTTGTTCACGGGCGGTATGTCCTAAGTAGCATCTAC

GCGGTCTGTGCCCTGGCTGCGTTGACTTGCTTCGTCATTAGGTTTGCAAAGAATTGCATGTCCTGGCGCT

ACGCGTGTACCAGATATACCAACTTTCTTCTGGACACTAAGGGCGGACTCTATCGTTGGCGGTCGCCTGT

CATCATAGAGAAAAGGGGCAAAGTTGAGGTCGAAGGTCATCTGATCGACCTCAAAAGAGTTGTGCTTGA

TGGTTCCGTGGCAACCCCTATAACCAGAGTTTCAGCGGAACAATGGGGTCGTCCTTAG

3. ลำดับเบสของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดpcDNA-GP5-PADRE

TGCTTGGTCCGCCACCATGGTGGAGAAATGCTTGACCGCGGGCTGTTGCTCGCAATTGCTTTCTTTGTGG

TGTATCGTGCCGTTCTGTTTTGCTGTGCTCGCCAACGCCAGCAACGCCAAGTTCG

33aa

TGGCTGCTGGACCCTGAAGGCTGCCGCTGACAGCAGCTCCCATCTACAGCTGATTTACAACT

PADRE34aa

TGACGCTATGTGAGCTGAATGGCACAGATTGGCTAGCTAACAAATGATTGGGCAGTGGAGAGTTTTGTC

ATCTTTCCCGTACTAACTCACATCATTTCCTATTGTGCTCTCACCACGAGCCATTTCCTTGATACAGTCG

GTCTGGTTACTGTGTCCACCGCCGGGTTTGTTCACGGGCGGTATGTCCTAAGTAGCATCTACGCGGTCT

GTGCCCTGGCTGCGTTGACTTGCTTCGTCATTAGGTTTGCAAAGAATTGCATGTCCTGGCGCTACGCGTG

TACCAGATATACCAACTTTCTTCTGGACACTAAGGGCGGACTCTATCGTTGGCGGTCGCCTGTCATCATA

GAGAAAAGGGGCAAAGTTGAGGTCGAAGGTCATCTGATCGACCTCAAAAGAGTTGTGCTTGATGGTTCC

GTGGCAACCCCTATAACCAGAGTTTCAGCGGAACAATGGGGTCGTCCTTTGCGGCCGCTCGAGTCTAGA

ATGGCTAGCAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTGTTGAATTAGATGGTGATGTTA

ATGGGCACAAATTTTCTGTCAGTGGAGAGGGTGAAAGGTGATGCTACATACGGAAAGCTTACCCTTAAAT

TTATTTGCACTACTGGAAAACTACCTGTTCCATGGCCAACACTTGTCACTACTTTCTCTTATGGTGTTCA

ATGCTTTTCCCGTTATCCGGATCATATGAAACGGCATGACTTTTTCAGAGTGCCATGCCCGAAGGTTATG

GTACAGGGAACGCACTATATC

GFP

บทที่ 5
วิจารณ์และสรุปผล

ปัจจุบันในประเทศไทยมีวัคซีนไวรัสพีอาร์อาร์เอสทั้งชนิดเชื้อเป็นและเชื้อตายจำหน่าย และวัคซีนไวรัสพีอาร์อาร์เอสชนิดเชื้อเป็นมีทั้งสายพันธุ์ยุโรปและอเมริกาเหนือ ส่วนวัคซีนไวรัสพีอาร์อาร์เอสชนิดเชื้อตายมีเฉพาะสายพันธุ์ยุโรป แต่สำหรับฟาร์มที่มีการใช้วัคซีนพีอาร์อาร์เอสเพื่อควบคุมโรคพบว่าเกษตรกรนิยมใช้วัคซีนพีอาร์อาร์เอสชนิดเชื้อเป็นสายพันธุ์อเมริกาเหนือเพื่อการควบคุมโรคพีอาร์อาร์เอสในฟาร์ม มากกว่าการใช้วัคซีนเชื้อเป็นสายพันธุ์ยุโรป และใช้วัคซีนพีอาร์อาร์เอสชนิดเชื้อเป็นมากกว่าการใช้วัคซีนพีอาร์อาร์เอสชนิดเชื้อตาย จากการใช้วัคซีนพีอาร์อาร์เอสชนิดเชื้อเป็นสายพันธุ์อเมริกาเหนืออย่างแพร่หลาย และมีรายงานการกลายพันธุ์ของวัคซีนเชื้อเป็นสายพันธุ์อเมริกาเหนือจากต่างประเทศเช่นประเทศเดนมาร์ก จนเป็นสาเหตุของการเกิดโรคในฟาร์ม (Botner et al., 1997; Nielsen et al., 2001) จึงเป็นมูลเหตุจูงใจให้ดำเนินการวิจัยเพื่อศึกษาการการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสในฟาร์มที่ใช้วัคซีนพีอาร์อาร์เอสชนิดเชื้อเป็นสายพันธุ์อเมริกาเหนือเพื่อป้องกันและควบคุมโรค โดยการศึกษานี้ เน้นการติดตามการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส ส่วนโออาร์เอฟห้าทั้งสองสายพันธุ์ทั้งก่อนและหลังการใช้วัคซีนชนิดเชื้อเป็นสายพันธุ์อเมริกาเหนือหลังเกิดการระบาดของโรคพีอาร์อาร์เอสในฟาร์ม

จากการติดตามลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสภายในฟาร์มที่ดำเนินการวิจัยเป็นเวลานานกว่า 6 เดือนก่อนการฉีดวัคซีน พบว่าฟาร์มที่ดำเนินการวิจัยมีเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสทั้งสองสายพันธุ์ โดยพบเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรป 2 คลัสเตอร์ คือคลัสเตอร์ที่ 1 และ 2 แต่กลับพบเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือเพียง 1 คลัสเตอร์คือคลัสเตอร์ที่ 1 เท่านั้น ในกรณีของสายพันธุ์ยุโรปพบว่าคลัสเตอร์ที่ 2 เริ่มพบในช่วงที่เกิดการระบาดของโรค เนื่องจากฟาร์มที่ดำเนินการวิจัยเป็นฟาร์มที่มีเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสในฝูงอยู่แล้วและเกิดการระบาดซ้ำขึ้น จึงเป็นไปได้ว่าเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสเอสสายพันธุ์ยุโรปคลัสเตอร์ที่ 1 และสายพันธุ์อเมริกาเหนือคลัสเตอร์ที่ 1 น่าจะเป็นเชื้อประจำถิ่น (endemic) ของฟาร์ม ส่วนเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรปคลัสเตอร์ที่ 2 น่าจะเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดการระบาดของโรคขึ้นซ้ำภายในฟาร์ม

หลังการใช้วัคซีนชนิดเชื้อเป็นสายพันธุ์อเมริกาเหนือ พบว่าเชื้อไวรัสทั้งสองสายพันธุ์ที่แยกได้ภายในฟาร์มมีการเปลี่ยนแปลงที่ไม่ขึ้นต่อกัน ทั้งสองสายพันธุ์มีการเปลี่ยนแปลงอิสระในส่วนสายพันธุ์เดียวกันเองและการฉีดวัคซีนเชื้อเป็นสายพันธุ์อเมริกาเหนือไม่ได้ส่งผลต่อการเร่งการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรป โดยเฉพาะในตำแหน่งสำคัญเช่นตำแหน่ง decoy epitope A และ neutralizing epitope B ของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรป และจากตรวจพบเชื้อจำนวน 2 คลัสเตอร์เท่าเดิม เท่ากันกับจำนวนคลัสเตอร์ก่อนที่จะมีการฉีดวัคซีนเชื้อเป็นสายพันธุ์อเมริกาเหนือ แต่อย่างไรก็ตามพบว่า สายพันธุ์ยุโรปมีการเปลี่ยนแปลงที่มากกว่าในการเปลี่ยนแปลงชนิดการทดแทนส่วนนิวคลีโอไทด์ ในตำแหน่งอื่นที่ไม่ใช่ตำแหน่ง neutralizing epitope ซึ่งผลการทดลองอาจสรุปได้ว่าการใช้วัคซีนเชื้อเป็นสายพันธุ์อเมริกาเหนือไม่

ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสสายพันธุ์ยุโรปและอาจไม่ส่งผลต่อ selective pressure (Borrego et al., 1993) ของเชื้อไวรัส

แต่อย่างไรก็ตามพบว่าวัคซีนเชื้อเป็นสายพันธุ์อเมริกาเหนืออาจส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ โดยในส่วนสายพันธุ์อเมริกาเหนือมีการเปลี่ยนแปลงสำคัญที่พบคือสามารถแยกเชื้อได้ทั้งหมด 4 คลัสเตอร์หลังฉีดวัคซีนพีอาร์อาร์เอสชนิดเชื้อเป็นในฟาร์มสุกร โดยพบว่ามีไวรัสเพิ่มมากกว่าจากเดิมจำนวน 3 คลัสเตอร์ (คลัสเตอร์ที่ 2 – 4) และพบการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่สำคัญในส่วน decoy epitope A และตำแหน่งที่สามารถเกิดขบวนการ N-linked glycosylation

เชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสในคลัสเตอร์ที่ 1 เป็นเชื้อคลัสเตอร์หลักในฟาร์ม เป็นกลุ่มที่ตรวจพบตั้งแต่ก่อนการฉีดวัคซีนและยังคงตรวจพบทุกเดือนตลอดการทดลอง สมมติฐานที่น่าเป็นไปได้คือเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสในคลัสเตอร์ที่ 1 เป็นคลัสเตอร์ที่น่าจะเป็นเชื้อประจำถิ่น (endemic) ของฟาร์ม สาเหตุเนื่องจากเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสมีการติดเชื้อระยะยาวหรือถาวร (persistent infection) (Wills et al., 1997; Allende R. et al., 2000) คลัสเตอร์ที่ 2 พบหลังการใช้วัคซีน แต่พบไม่สม่ำเสมอ และมีเปอร์เซนต์ความเหมือนทั้งระดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนกับคลัสเตอร์ที่ 1 มากกว่าคลัสเตอร์ 3 และ 4 จากการวิเคราะห์โดยแขนงกิ่งต้นไม้ (Phylogenetic tree) และลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน มีความเป็นไปได้ที่คลัสเตอร์ที่ 2 มีวิวัฒนาการจากการเปลี่ยนแปลงจากคลัสเตอร์ที่ 1 ส่วนเชื้อไวรัสในคลัสเตอร์ที่ 3 พบว่ามีความเหมือนไวรัสวัคซีนถึง 99.5% พบหลังจากใช้วัคซีนได้เพียง 1 เดือนหลังจากนั้นไม่พบ ซึ่งอาจเกิดจากไวรัสของวัคซีน เพราะเนื่องจากตรวจพบในลูกสุกรดูดนม (ในลูกสุกรดูดนมได้รับวัคซีนช่วงอายุ 10 – 14 วัน) และ ส่วนคลัสเตอร์ที่ 4 เป็นกลุ่มที่พบเพิ่มขึ้นหลังการใช้วัคซีน และพบต่อเนื่อง จากการวิเคราะห์แขนงกิ่งต้นไม้พบว่ามีความเหมือนกับวัคซีนไวรัสอยู่สูง มีเปอร์เซนต์ความเป็นไปได้ที่มีวิวัฒนาการมาจากวัคซีนเชื้อเป็นหลังการใช้วัคซีน

จากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของเชื้อพบว่าสายพันธุ์อเมริกาเหนือ นอกเหนือจากการเพิ่มจำนวนของคลัสเตอร์ที่พบแล้ว ยังพบว่าเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือมีการเปลี่ยนแปลงมากในตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 26 – 39 (Dea, S et al., 2000) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มี decoy epitope และ neutralizing epitope โดยการเปลี่ยนแปลงหลักพบว่ามีการเกิด N linked glycosylation สาเหตุหลักอาจเนื่องจากการที่บริเวณดังกล่าวมีผลในการกระตุ้นนิวทรัลไลซ์ซิ่งแอนติบอดี้ (Ostrowski, M et al., 2002; Plagemann, P.G et al., 2002) และส่วนของการเกิด N-linked glycosylation มีผลต่อการหลบหลีกต่อนิวทรัลไลซ์ซิ่งแอนติบอดี้ และการเกิดนิวทรัลไลซ์ซิ่งแอนติบอดี้ (Chen Z et al., 2000; Jiang, W etal., 2007; Ansari, I.H et al., 2006; Faaberg, K.S et al., 2006) จึงเป็นแรงกดดันต่อไวรัสจากการคัดเลือกจากแรงกดดัน (Selective pressure) ให้เกิดการเปลี่ยนแปลง (Borrego et al., 1993) ส่วนของสายพันธุ์อเมริกาเหนือ เมื่อวิเคราะห์กรดอะมิโนนอกเหนือจากบริเวณ N-linked glycosylation แล้ว โดยเฉพาะอะมิ

โนตำแหน่ง 13 และ 151 ซึ่งเป็นเพียงสองตำแหน่งในส่วนโออาร์เอฟห้าที่ไวรัสต้นแบบ (VR2332) ที่ถูกพัฒนามาเป็นวัคซีนชนิดเชื้อเป็นสายพันธุ์อเมริกาเหนือ (Ingelvac PRRS MLV, Boehringer Ingelheim, USA) ที่ใช้ในการทดลองมีความแตกต่างกัน ในส่วนของ VR2332 คือ R^{13} และ R^{151} แต่วัคซีนคือ Q^{13} และ G^{151} ตามลำดับ (ภาพที่ 10) ในกลุ่ม 1 และ 2 ตำแหน่ง 13 พบ R^{13} แต่กลุ่มที่ 3 และ 4 พบ Q^{13} ส่วนตำแหน่งที่ 151 ทุกกลุ่มพบ K^{151} ยกเว้นกลุ่มที่ 3 พบ I^{151} (ซึ่งต่างจากวัคซีนทั้งที่กลุ่มนี้มีความเหมือนวัคซีนถึง 99.5%)

ขบวนการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรป หลังการใช้วัคซีนชนิดเชื้อเป็นสายพันธุ์อเมริกาเหนือ พบว่ามีความต่างจากเชื้อไวรัสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ โดยเกิดการเปลี่ยนในตำแหน่งที่ไม่สำคัญ และเป็นการเปลี่ยนแปลงแบบสุ่ม (random mutation) ที่เกิดขึ้นทั่วไปในเชื้อไวรัสที่มีคุณสมบัติเบบ quasi-species เนื่องจากการเก็บตัวอย่างจากฟาร์มที่ใช้วัคซีนชนิดเชื้อเป็นสายพันธุ์อเมริกาเหนือ จึงยังสรุปไม่ได้ว่าถ้ามีการใช้วัคซีนพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรปชนิดเชื้อเป็นในฟาร์มจะพบการเปลี่ยนแปลงแบบเดียวกันหรือไม่ ฉะนั้นควรจะมีการศึกษาต่อโดยต้องดำเนินการศึกษาในรูปแบบเดียวกันในฟาร์มที่ได้รับการฉีดวัคซีนไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรปชนิดเชื้อเป็นเป็นโปรแกรม

การเกิดการผสมสารพันธุกรรม (Recombination) หลังการใช้วัคซีนพบเฉพาะในสายพันธุ์ยุโรปในเดือนที่ 10 แต่การตรวจไม่พบการผสมสารพันธุกรรม (Recombination) ในสายพันธุ์อเมริกาเหนือ ไม่ใช่หมายความว่าไม่เกิดการผสมสารพันธุกรรม แต่การทดลองไม่สามารถตรวจพบได้ อาจเกิดเนื่องมาจากจำนวนตัวอย่างที่น้อยเกินไป การเกิดการผสมสารพันธุกรรม (Recombination) สามารถพบได้และได้มีรายงานมาก่อนหน้านี้ (Li, B et al., 2009; Yuan, S et al., 1999)

จากการสุ่มการเก็บตัวอย่างในแต่ละประชากรสุกรทั้ง 4 กลุ่ม (ลูกสุกรดูดนม, สุกรอนุบาล, สุกรขุน และ สุกรสาวทดแทน) เพื่อดูความหลากหลายพันธุกรรมของไวรัสทั้งสองสายพันธุ์พบว่าในส่วนสายพันธุ์ยุโรปไม่มีความแตกต่างในระหว่างประชากรสุกรแต่ละกลุ่ม ส่วนสายพันธุ์อเมริกาเหนือพบว่าในไวรัสกลุ่มที่ 1 (คาดว่าเป็นเชื้อ endemic) ที่พบก่อนและหลังการใช้วัคซีนไม่มีความแตกต่างในแต่ละกลุ่มประชากรสุกร แต่ไวรัสกลุ่มที่ 2 และ 4 ที่พบเพิ่มขึ้นหลังใช้วัคซีนจะพบในสัดส่วนที่มากกว่าในลูกสุกรดูดนมเมื่อเทียบกับสุกรกลุ่มอื่นโดยเฉพาะไวรัสกลุ่มที่ 4 ที่เริ่มพบในเดือนที่ 5 จนสิ้นสุดการเก็บตัวอย่าง ยังไม่ทราบเป็นเพราะสาเหตุใด ข้อน่าสังเกตุเนื่องจากการเก็บตัวอย่างเก็บจากลูกสุกรดูดนมอายุ 2 สัปดาห์ ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่ลูกสุกรอยู่ภายใต้อิทธิพลของ passive immune (Marternal immunity) จากแม่สุกรซึ่งยังไม่ทราบว่ามีความเกี่ยวข้องหรือไม่ต้องทำการศึกษาต่อไป

ผลที่ได้รับจากการดำเนินการวิจัยพบว่าทั้งสองสายพันธุ์มีการเปลี่ยนแปลงส่วนโออาร์เอฟห้าซึ่งเป็นส่วนการสร้างโปรตีนโครงสร้างแบบชนิดการเปลี่ยนแปลงการทดแทนนิวคลีโอไทด์ ซึ่งสอดคล้องกับการพบว่าส่วน NSP2 ซึ่งไม่ใช่ส่วนโปรตีนโครงสร้างสามารถเกิดการขาดหายหรือเพิ่มขึ้นของนิวคลีโอไทด์โดยไวรัสยังคง

สามารถดำรงอยู่ได้ (de Lima et al., 2008; Fang Y et al., 2008; Kim D.Y. et al., 2009) ต่างจากโปรตีนส่วนโครงสร้างการเพิ่มขึ้นหรือขาดหายไปมีผลต่อการดำรงชีวิตอยู่ได้ของไวรัส (Meulenberg et al., 1998; Yoo D et al., 2004) และพบการเปลี่ยนแปลงลักษณะนี้ในไวรัสสายพันธุ์ยุโรปมากกว่าสายพันธุ์อเมริกาเหนือ ส่วนวัคซีนไวรัสพีอาร์อาร์เอสชนิดเชื้อเป็นสายพันธุ์อเมริกาเหนือไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสสายพันธุ์ยุโรปในฟาร์ม แต่ส่งผลโดยตรงต่อเชื้อไวรัสสายพันธุ์อเมริกาเหนือโดยเร่งการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม โดยพบว่าการเปลี่ยนแปลงที่สำคัญคือการเกิด N-linked glycosylation บริเวณตำแหน่ง 30-35 ทางด้าน N-terminal ในส่วนของ ectodomain การเปลี่ยนแปลงส่วนนี้อาจมีผลต่อการเกิดการหลบหลีกทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสและส่งผลต่อลักษณะอาการป่วยสุกรตลอดเวลา (small outbreak) ฉะนั้นการวิวัฒนาการของการผลิตวัคซีนควรจะคำนึงว่าจะทำอย่างไรไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงส่วนนี้

สรุป

จากผลการทดลองที่ได้จากงานวิจัยฉบับนี้ทำให้สามารถสรุปได้ว่า การฉีดวัคซีนพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือในฟาร์มที่มีการติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสทั้งสองสายพันธุ์ ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรป แต่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ โดยเร่งให้เกิดการกลายพันธุ์ในเชื้อที่มีอยู่เดิมก่อนเกิดการระบาด และการกลายพันธุ์พบในตำแหน่งสำคัญคือตำแหน่ง Decoy และ neutralizing epitopes โดยมีขบวนการที่สำคัญคือการเปลี่ยนแปลงของตำแหน่ง N-linked glycosylation การเปลี่ยนแปลงนี้อาจส่งผลให้เชื้อไวรัสเดิมสามารถหลบหลีกภูมิคุ้มกันของร่างกาย นอกจากนั้นแล้วยังพบว่าวัคซีนพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือก่อให้เกิดไวรัสคลัสเตอร์ใหม่ภายในฟาร์ม โดยเป็นเชื้อไวรัสที่มีลักษณะทางพันธุกรรมที่คล้ายกับวัคซีน

เอกสารอ้างอิง

Alexander, J., del Guercio, M.F., Maewal, A., Qiao, L., Fikes, J., Chesnut, R.W., Paulson, J., Bundle, D.R., DeFrees, S., Sette, A., 2000, Linear PADRE T helper epitope and carbohydrate B cell epitope conjugates induce specific high titer IgG antibody responses. J Immunol 164, 1625-1633.

Bassaganya-Reira, J., Yu, S., Thacker, B.J., Straint, E., Wannemuehler, M.J., Thacker, E.L., 1999, Effects of repeated porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccinations on lymphocyte recall responses in sows. Proc of Conference for Research Workers in Animal Disease, 83.

Bassaganya-Riera, J., Thacker, B.J., Yu, S., Strait, E., Wannemuehler, M.J., Thacker, E.L., 2004, Impact of immunizations with porcine reproductive and respiratory syndrome virus on lymphoproliferative recall responses of CD8(+) T cells. Viral Immunol 17, 25-37.

Botner, A., Nielsen, J., Bille-Hansen, V., 1994, Isolation of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a Danish swine herd and experimental infection of pregnant gilts with the virus. Vet Microbiol 40, 351-360.

Botner, A., Strandbygaard, B., Sorensen, K.J., Have, P., Madsen, K.G., Madsen, E.S., Alexandersen, S., 1997, Appearance of acute PRRS-like symptoms in sow herds after vaccination with a modified live PRRS vaccine. Vet Rec 141, 497-499.

Cavanagh, D., 1997, Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. Arch Virol 142, 629-633.

Chang, C.C., Yoon, K.J., Zimmerman, J.J., Harmon, K.M., Dixon, P.M., Dvorak, C.M., Murtaugh, M.P., 2002, Evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus during sequential passages in pigs. J Virol 76, 4750-4763.

Collins, J.E., Benfield, D.A., Christianson, W.T., Harris, L., Hennings, J.C., Shaw, D.P., Goyal, S.M., McCullough, S., Morrison, R.B., Joo, H.S., et al., 1992, Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. J Vet Diagn Invest 4, 117-126.

del Guercio, M.F., Alexander, J., Kubo, R.T., Arrhenius, T., Maewal, A., Appella, E., Hoffman, S.L., Jones, T., Valmori, D., Sakaguchi, K., Grey, H.M., Sette, A., 1997, Potent immunogenic short linear peptide constructs composed of B cell epitopes and Pan DR T helper epitopes (PADRE) for antibody responses in vivo. Vaccine 15, 441-448.

Domingo, E., 1992, Genetic variation and quasi-species. Curr Opin Genet Dev 2, 61-63.

Goldberg, T.L., Lowe, J.F., Milburn, S.M., Firkins, L.D., 2003, Quasispecies variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus during natural infection. Virology 317, 197-207.

Kim, H.S., Kwang, J., Yoon, I.J., Joo, H.S., Frey, M.L., 1993, Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line. Arch Virol 133, 477-483.

Kwang, J., Zuckermann, F., Ross, G., Yang, S., Osorio, F., Liu, W., Low, S., 1999, Antibody and cellular immune responses of swine following immunisation with plasmid DNA encoding the PRRS virus ORF's 4, 5, 6 and 7. Res Vet Sci 67, 199-201.

Madsen, K.G., Hansen, C.M., Madsen, E.S., Strandbygaard, B., Botner, A., Sorensen, K.J., 1998, Sequence analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus of the American type collected from Danish swine herds. Arch Virol 143, 1683-1700.

Meng, X.J., Paul, P.S., Halbur, P.G., Lum, M.A., 1995a, Phylogenetic analyses of the putative M (ORF 6) and N (ORF 7) genes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): implication for the existence of two genotypes of PRRSV in the U.S.A. and Europe. Arch Virol 140, 745-755.

Meng, X.J., Paul, P.S., Halbur, P.G., Morozov, I., 1995b, Sequence comparison of open reading frames 2 to 5 of low and high virulence United States isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. J Gen Virol 76 (Pt 12), 3181-3188.

Mengeling, W.L., Lager, K.M., Vorwald, A.C., Koehler, K.J., 2003, Strain specificity of the immune response of pigs following vaccination with various strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Vet Microbiol 93, 13-24.

Meulenberg, J.J., Petersen den Besten, A., de Kluyver, E., van Nieuwstadt, A., Wensvoort, G., Moormann, R.J., 1997, Molecular characterization of Lelystad virus. Vet Microbiol 55, 197-202.

Murtaugh, M.P., Faaberg, K.S., Laber, J., Elam, M., Kapur, V., 1998, Genetic variation in the PRRS virus. Adv Exp Med Biol 440, 787-794.

Neumann, E.J., Kliebenstein, J.B., Johnson, C.D., Mabry, J.W., Bush, E.J., Seitzinger, A.H., Green, A.L., Zimmerman, J.J., 2005, Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. J Am Vet Med Assoc 227, 385-392.

Nielsen, H.S., Oleksiewicz, M.B., Forsberg, R., Stadejek, T., Botner, A., Storgaard, T., 2001, Reversion of a live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine investigated by parallel mutations. J Gen Virol 82, 1263-1272.

Nilubol, D., Platt, K.B., Halbur, P.G., Torremorell, M., Harris, D.L., 2004, The effect of a killed porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine treatment on virus shedding in previously PRRSV infected pigs. Vet Microbiol 102, 11-18.

Nilubol, D., Tripipat, T., Hoonsuwan, T., Tipsombatboon, P., Piriyapongsa, J., 2013, Genetic diversity of the ORF5 gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) genotypes I and II in Thailand. Arch Virol 158, 943-953.

Ostrowski, M., Galeota, J.A., Jar, A.M., Platt, K.B., Osorio, F.A., Lopez, O.J., 2002, Identification of neutralizing and nonneutralizing epitopes in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 ectodomain. J Virol 76, 4241-4250.

Plagemann, P.G., 2004, GP5 ectodomain epitope of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, strain Lelystad virus. Virus Res 102, 225-230.

Plagemann, P.G., Rowland, R.R., Faaberg, K.S., 2002, The primary neutralization epitope of porcine respiratory and reproductive syndrome virus strain VR-2332 is located in the middle of the GP5 ectodomain. Arch Virol 147, 2327-2347.

Thanawongnuwech, R., Amonsin, A., Tatsanakit, A., Damrongwatanapokin, S., 2004, Genetics and geographical variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Thailand. Vet Microbiol 101, 9-21.

Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994, CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res 22, 4673-4680.

Wensvoort, G., de Kluyver, E.P., Pol, J.M., Wagenaar, F., Moormann, R.J., Hulst, M.M., Bloemraad, R., den Besten, A., Zetstra, T., Terpstra, C., 1992, Lelystad virus, the cause of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome: a review of mystery swine disease research at Lelystad. Vet Microbiol 33, 185-193.

Yuan, S., Nelsen, C.J., Murtaugh, M.P., Schmitt, B.J., Faaberg, K.S., 1999, Recombination between North American strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Virus Res 61, 87-98.

ภาคผนวก

ผลผลิตที่ได้จากงานวิจัย

แบ่งผลผลิตที่ได้จากงานวิจัยออกเป็น 4 ประเภทประกอบด้วยดังต่อไปนี้

1. งานตีพิมพ์ในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติจำนวน 2 ฉบับ

   Hoonsuwan, T., Tripipat, T., Kitrungloadjanaporn, P., Laopracha, S. and Nilubol, D. 2010. Genetic variation of PRRSV ORF5 following modified live PRRSV vaccination in a PRRSV positive herd. The 2010 International PRRS symposium. The Chicago Marriott, Downtown Magnificent Mile, Chicago, Illinois, USA. 3-4 December 2010: 90.

   Hoonsuwan T, Tripipat T, Nilubol D. Genetic variation of PRRSV ORF5 following modified live PRRSV vaccination in a PRRSV positive herd. Proc of the 37th International Conference on Veterinary Science 2012, Impact Meung Thang Thani, Bangkok, Thailand, 29 February – 2 Mar 2012

2. งานตีพิมพ์วารสารระดับนานาชาติจำนวน 1 ฉบับ

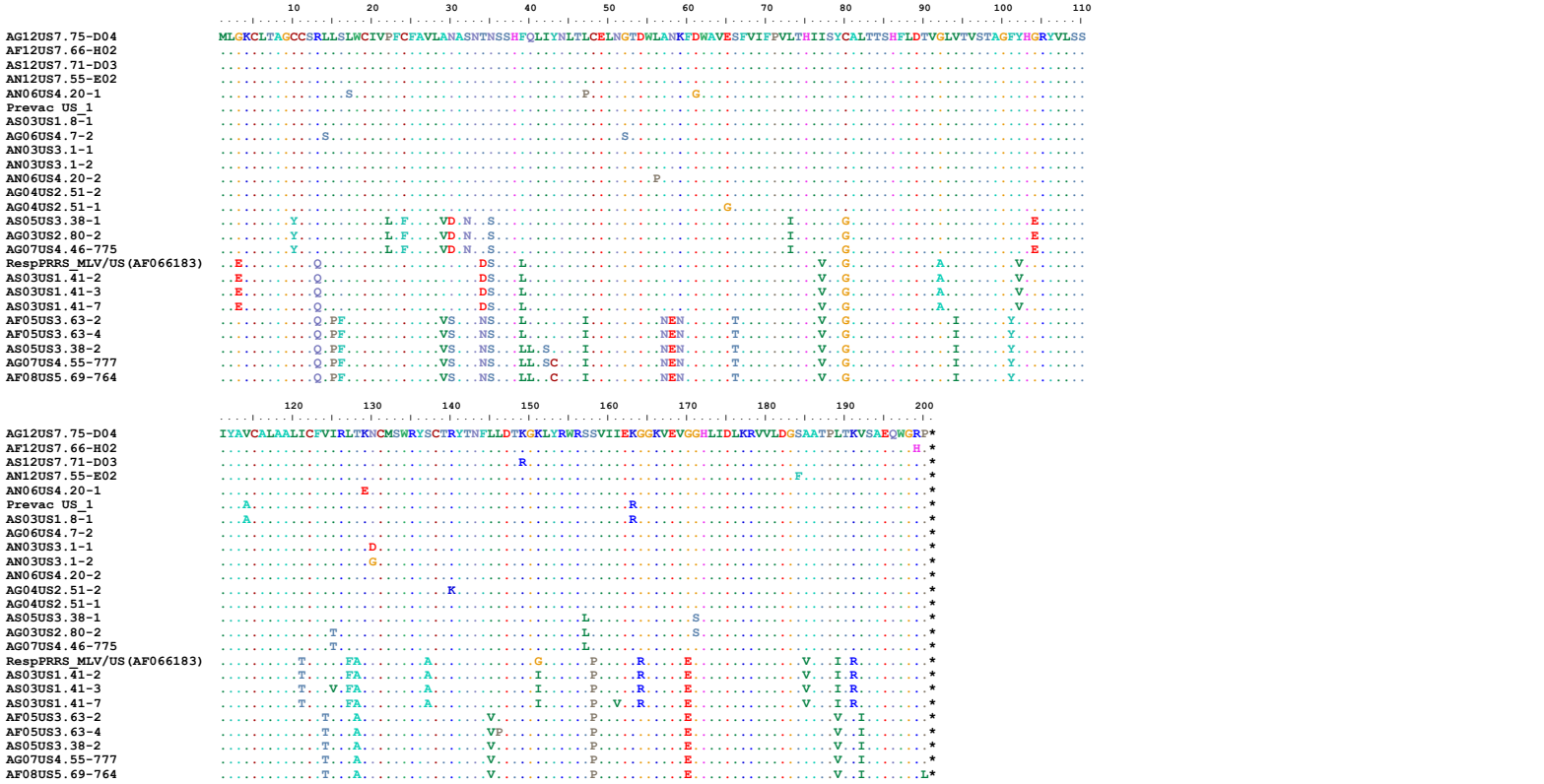
   Nilubol D, Tripipat T, Hoonsuwan T, Tipsombatboon P, Piriyapongsa J. Dynamics and evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) ORF5 following modified live PRRSV vaccination in a PRRSV-infected herd. Arch Virol. 2013. Aug 13. [Epub ahead of print] DOI: 10.1007/s00705-013-1781-9 (2011 Impact factor 2.111)

3. นิสิตจบการศึกษาระดับปริญญาโทจำนวน 1 คน

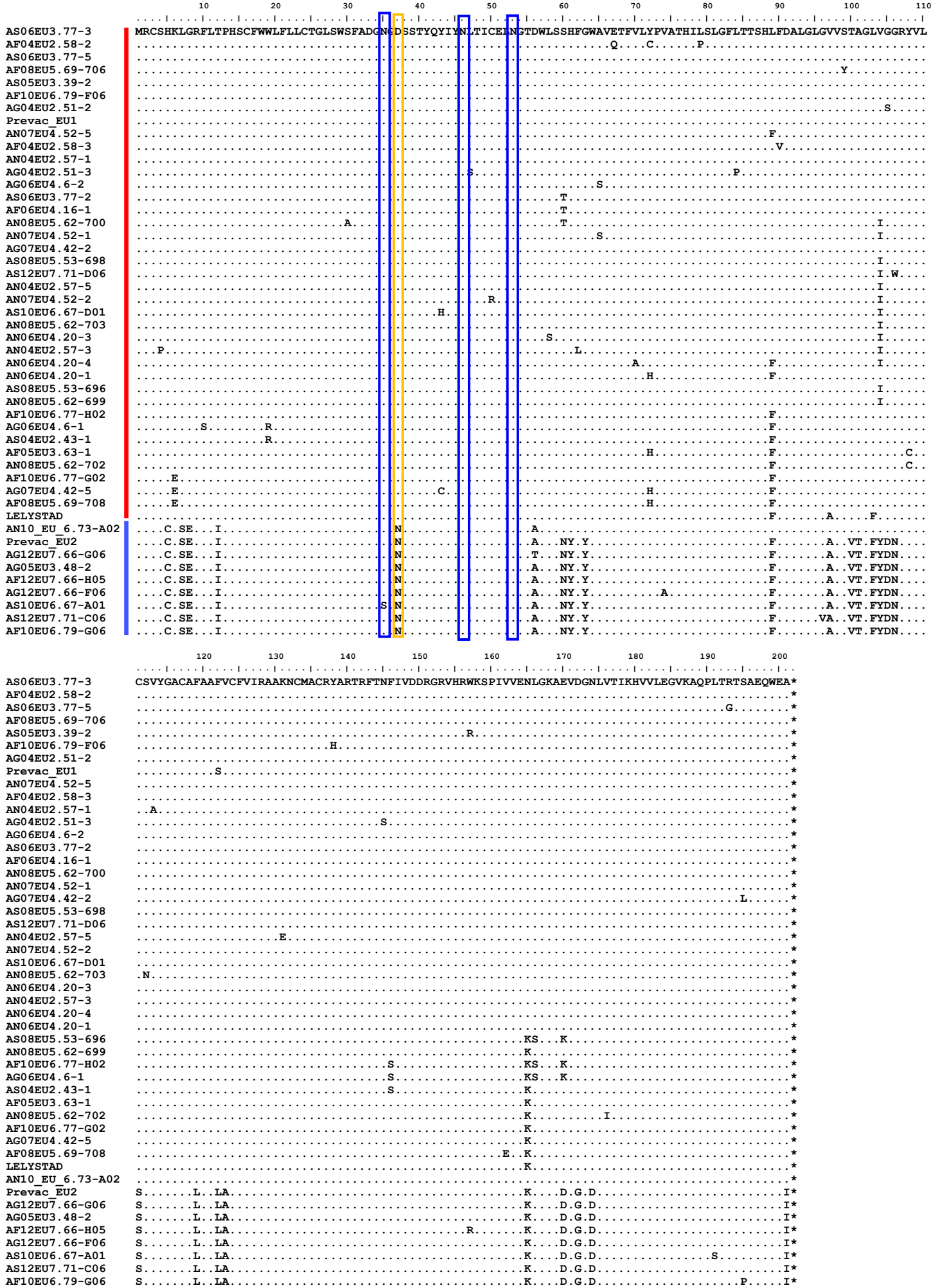
   a. น.สพ. ธวัชชัย หุ่นสุวรรณ จบการศึกษาระดับปริญญาโทปีการศึกษา 2555 จากโปรแกรมพยาธิชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. ต้นแบบดีเอ็นเอวัคซีน ที่มีส่วนประกอบของยีน ORF5 และมีการแทรก PADRE ระหว่าง N-liked glycosylation site และ neutralizing epitope B

ภาคผนวก 1 ลำดับกรดอะมิโนของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ


AG12US7.75-D04
AF12US7.66-H02
AS12US7.71-D03
AN12US7.55-E02
AN06US4.20-1
Prevac US_1
AS03US1.8-1
AG06US4.7-2
AN03US3.1-1
AN03US3.1-2
AN06US4.20-2
AG04US2.51-2
AG04US2.51-1
AS05US3.38-1
AG03US2.80-2
AG07US4.46-775
RespPRRS_MLV/US(AF066183)
AS03US1.41-2
AS03US1.41-3
AS03US1.41-7
AF05US3.63-2
AF05US3.63-4
AS05US3.38-2
AG07US4.55-777
AF08US5.69-764

ภาคผนวก 2 ลำดับกรดอะมิโนของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรป


AS06EU3.77-3 MRCSHKLGRFLTPHSCFWWLFLLCTGLSWSFADGNCDSSTYQYIYNLTICELNGTDWLSSHFGWAVETFVLYPVATHILSLGFLTTSHLFDALGLGVVSTAGLVGGRYVL
AF04EU2.58-2
AS06EU3.77-5
AF08EU5.69-706
AS05EU3.39-2
AF10EU6.79-F06
AG04EU2.51-2
Prevac_EU1
AN07EU4.52-5
AF04EU2.58-3
AN04EU2.57-1
AG04EU2.51-3
AG06EU4.6-2
AS06EU3.77-2
AF06EU4.16-1
AN08EU5.62-700
AN07EU4.52-1
AG07EU4.42-2
AS08EU5.53-698
AS12EU7.71-D06
AN04EU2.57-5
AN07EU4.52-2
AS10EU6.67-D01
AN08EU5.62-703
AN06EU4.20-3
AN04EU2.57-3
AN06EU4.20-4
AN06EU4.20-1
AS08EU5.53-696
AN08EU5.62-699
AF10EU6.77-H02
AG06EU4.6-1
AS04EU2.43-1
AF05EU3.63-1
AN08EU5.62-702
AF10EU6.77-G02
AG07EU4.42-5
AF08EU5.69-708
LELYSTAD
AN10_EU_6.73-A02
Prevac_EU2
AG12EU7.66-G06
AG05EU3.48-2
AF12EU7.66-H05
AG12EU7.66-F06
AS10EU6.67-A01
AS12EU7.71-C06
AF10EU6.79-G06
CSVYGACAFAAFVCFVIRAAKNCMACRYARTRFTNFIVDDRGRVHRWKSPIVVENLGKAEVDGNLVTIKHVVLEGVKAQPLTRTSAEQWEA*